

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

LA COAGULATION DU SANG ET LA GENÈSE DE LA THROMBINE

par les D^{rs} J. BORDET et L. DELANGE

(Suite et fin.)

§ II. — LA RÉACTION DES PLAQUETTES AVEC LE SÉRUM.

Naunyn, Rauschenbach, Foa et Pellacani, Wooldridge, ont signalé l'action accélératrice de certains extraits d'organes (muscles, rate, foie, intestin, etc.), sur la coagulation du sang. Les travaux de Delezenne, de Spangaro, d'Arthus, ont montré combien la coagulation est hâtée lorsque le sang peut se mélanger, lors de la saignée, à des traces de suc de la plaie opératoire. Arthus a vu que le suc de tissu ne contient pas de thrombine préformée, car, même en milieu calcifié, il ne coagule pas la solution pure de fibrinogène. Morawitz, Fuld et Spiro ont mis en évidence ce fait capital que la teneur du sérum en thrombine s'élève considérablement lorsqu'on le mélange à l'extrait de tissus. Ces auteurs ont déduit de cette constatation que la thrombine naît de la réaction de deux substances, l'une existant dans les cellules de nombreux tissus — et aussi dans les cellules blanches du sang, — l'autre répandue dans le plasma dont le sérum dérive. Fuld et Spiro ont désigné ces matières, la première sous le nom de cytozyme, la seconde sous le nom de plasmozyme. Morawitz les a appelées respectivement thrombokinasé et thrombogène.

D'après Morawitz et les autres auteurs qui se sont occupés de la thrombokinasé ou cytozyme, cette substance est thermolabile ; cette opinion ne concorde nullement avec nos observations.

Nos expériences nous ont montré que les suspensions de plaquettes lavées se rapprochent beaucoup des extraits de tissus, en ce sens qu'elles sont aptes, au contact du sérum, à fournir la thrombine en abondance. Nous appellerons cytozyme (désignation appliquée par Fuld et Spiro au principe actif de l'extrait de tissus) la substance active des plaquettes, et nous nommerons sérozyme la substance à laquelle le sérum doit son pouvoir de réagir avec le cytozyme des plaquettes pour fournir la thrombine.

Exp. XIII. — Du plasma oxalaté très limpide de lapin, oxalaté à 1 p. 1000 est additionné de 4 volumes d'EPCa (1). En raison de la pauvreté en plaquettes, la coagulation s'opère lentement. On défibrine dès qu'elle débute et l'on obtient un sérum pauvre en thrombine, que l'on conserve jusqu'au lendemain en vue de diminuer encore son faible pouvoir coagulant. Le lendemain donc, on prépare les mélanges suivants :

On verse dans deux tubes A et B 0,4 cent. cube d'EPCa et dans un tube C, 0,5 cent. cube de cette même solution (laquelle sert de véhicule et introduit en même temps un peu de sel calcique). On ajoute à A et B 0,1 cent. cube de sérum, obtenu comme il vient d'être dit. On laisse tomber ensuite en A et C une goutte de plaquettes lavées en suspension dans la solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000, en B une goutte de cette solution sans plaquettes. Bref, l'un des tubes (A) renferme à la fois du sérum et des plaquettes, les deux autres contiennent uniquement, soit du sérum, soit des plaquettes. Quelques minutes plus tard, on introduit dans les trois tubes 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation en bloc survient dans A en 3 à 4 minutes, C ne se coagule jamais, B reste liquide ou n'est que partiellement coagulé le lendemain (2).

L'addition de plaquettes, non coagulantes par elles-mêmes, à une dose de sérum d'ailleurs faible, a donc eu pour effet de rendre le liquide énergiquement coagulant. Il convient de rappeler que les plaquettes ont été, grâce à un lavage soigneux, débarrassées entièrement du plasma dans lequel elles bai-

(1) Rappelons une fois pour toutes que EPCa signifie solution physiologique de NaCl à 9 p. 1000 contenant environ un tiers p. 1000 de CaCl_2 , et que le plasma dilué dioxalaté est préparé par mélange de 1 volume de plasma limpide oxalaté à 1 p. 1000, avec 4 volumes de solution physiologique oxalatée à 2 p. 1000.

(2) La coagulation pénible qui s'opère en B tient naturellement à ce que ce mélange contient un peu de sérum, d'ailleurs pauvre en thrombine.

gnaient. Au surplus, il est aisé de prouver que les propriétés de la suspension de plaquettes ne sont nullement dues à une souillure éventuelle par des traces de plasma :

Exp. XIV. Identique à la précédente, sauf que dans les tubes A et C on introduit, au lieu d'une goutte de plaquettes, une goutte de plasma oxalaté très limpide. On ajoute après quelques minutes le plasma dioxalaté. Les mélanges sont encore liquides le lendemain.

Nous venons de voir que les plaquettes sans le secours du sérum, et même en milieu calcifié, ne libèrent pas de thrombine. Ajoutons qu'elles n'en libèrent pas davantage lorsque le contact avec le liquide calcifié dure longtemps. Elles n'en libèrent pas non plus au contact d'eau distillée (très légèrement calcifiée).

Morawitz, Fuld et Spiro ont vu que la production de thrombine dans le mélange de sérum avec l'extrait de tissus exige la présence de sels calciques solubles. Ceux-ci sont également nécessaires à la réaction qui s'établit entre les plaquettes et le sérum ; en milieu oxalaté, il ne se forme pas de thrombine. Les plaquettes ne favorisent nullement la coagulation du plasma par le sérum en milieu décalcifié ; l'expérience suivante démontre au surplus la nécessité des sels calciques :

Exp. XV. — Deux tubes A et B contiennent [0,35 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum (obtenu comme celui des expériences précédentes). Le tube A reçoit en outre 0,1 cent. cube d'oxalate à 0,5 p. 100. On ajoute alors aux deux tubes une goutte de plaquettes. Après un quart d'heure de contact, on introduit en B (qui n'a pas été oxalaté antérieurement) 0,1 cent. cube d'oxalate à 0,5 p. 100, et, 5 minutes plus tard, on additionne les deux tubes de 0,5 cent cube de plasma oxalaté dilué de 4 volumes de solution physiologique oxalatee à 1 p. 1000 (plasma dilué monoxalaté). Le liquide B se prend en masse en une minute, l'autre est encore fluide le lendemain.

On le voit, le mélange plaquettes-sérum ne fournit la thrombine qu'à la condition d'être réalisé en milieu calcifié. Mais si cette condition est remplie, le mélange peut, même s'il a été ultérieurement oxalaté, coaguler le plasma oxalaté.

En proportion convenable, le citrate sodique empêche la réaction même en milieu calcifié. On sait, par les recherches de Sabbatani, que, sans précipiter les sels calciques, le citrate met obstacle à leur ionisation. C'est ainsi qu'il s'oppose à leur pré-

cipitation par l'oxalate sodique. Dans un mélange de 0,2 cent. cube de plasma oxalaté, de 0,1 cent. cube de citrate sodique à 4 p. 100 et de 0,8 cent. cube d'EPCa, on ne constate pas l'apparition d'un trouble d'oxalate calcique, et le mélange ne se coagule pas. On sait d'autre part que le citrate se comporte comme l'oxalate, en ce qu'il n'empêche pas la coagulation par la thrombine lorsque celle-ci a pu se former au préalable :

Exp. XVI. — Quatre tubes contiennent 0,3 cent. cube d'EPCa et 0,2 cent. cube de sérum; on ajoute dans A 0,1 cent. cube de solution de citrate à 2 p. 100, et dans C et D même dose de solution physiologique. On laisse tomber ensuite une goutte de plaquettes en A, B et C. Quinze minutes plus tard on additionne B (qui n'avait reçu ni citrate ni solution physiologique) de 0,1 cent. cube de citrate, et l'on verse dans les quatre tubes, immédiatement après, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation en bloc survient dans B et C en une minute et demie. Dans A et D la coagulation n'est que partielle le lendemain.

La forte concentration saline s'oppose aussi à la production de thrombine aux dépens des plaquettes et du sérum. Si l'on dilue une solution concentrée de sel avec de l'eau distillée, et si l'on ajoute du sérum et des plaquettes, il y a formation de thrombine, qui coagule le plasma dioxalaté introduit après quelque temps. Mais si l'on mélange le sérum et les plaquettes dans la solution concentrée et si, après quelque temps, on ajoute l'eau distillée et, immédiatement après, le plasma dioxalaté, la coagulation ne s'opère pas :

Exp. XVII. — Une solution de NaCl à 10 p. 100 est additionnée de CaCl_2 de telle façon que sa teneur en ce dernier sel soit quadruple de celle de l'EPCa. On verse dans deux tubes A et B 0,2 cent. cube de cette solution concentrée et l'on ajoute à B 1,8 cent. cube d'eau distillée. On introduit ensuite dans chaque tube 0,4 cent. cube de sérum et 3 gouttes de plaquettes. Quarante minutes plus tard, on ajoute à A 1,8 cent. cube d'eau distillée et immédiatement après, aux deux tubes, 1,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation s'opère en B en cinq minutes, A est encore liquide le lendemain. La teneur saline ne doit donc pas être exagérée. Elle peut par contre, sans que cela nuise à la réaction du sérum sur les plaquettes, être abaissée dans une forte mesure :

Exp. XVIII. — On introduit dans un tube 0,4 cent. cube d'eau distillée contenant 0,3 p. 1000 de CaCl_2 . On ajoute 0,1 cent. cube de sérum et une goutte de plaquettes. Vingt minutes plus tard, on introduit 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Coagulation en moins d'une minute. Un mélange témoin montre que si l'on n'avait pas introduit de sérum, aucune coagulation ne se serait produite.

Reprenons maintenant la première expérience du présent chapitre (exp. XIII), et recherchons dans quelle mesure nous pouvons diminuer la dose de sérum tout en obtenant encore la coagulation du plasma dioxalaté. Le sérum éprouvé est obtenu comme dans les expériences précédentes, c'est-à-dire qu'il résulte de la défibrination de plasma oxalaté très limpide additionné de 4 volumes d'EPCa, et qu'il date de vingt-quatre heures environ.

Exp. XIX. — Ce sérum est introduit à doses variables dans des tubes contenant 0,5 cent. cube d'EPCa et une goutte de plaquettes. Après un quart d'heure on ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. On trouve ainsi qu'en présence des plaquettes une dose de 0,02 cent. cube de sérum suffit à provoquer la coagulation. Une dose moitié moindre (0,01) est inopérante : le mélange est encore liquide le lendemain. La dose minimale active se détermine ainsi assez nettement.

On peut d'autre part rechercher, en faisant agir une dose de sérum assez forte (0,1 ou 0,2 cent. cube par exemple), de combien on peut diluer la suspension de plaquettes pour qu'une goutte de cette dilution soit encore capable de provoquer la coagulation. La numération des plaquettes est naturellement chose difficile; nous nous bornerons à mentionner que les plaquettes agissent à dose très faible : si l'on introduit dans un tube contenant 0,5 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum, une goutte de suspension de plaquettes assez diluée pour que le mélange ne présente qu'un trouble extrêmement faible, presque imperceptible même, le plasma dioxalaté ajouté ultérieurement se coagule encore.

Il est aisé de déterminer la durée minima de contact entre les plaquettes et le sérum, que la production de thrombine exige. Cette détermination n'a d'ailleurs qu'une précision relative, car les résultats varient bien entendu suivant les conditions de dilution, peut-être aussi suivant la température ambiante, etc. On doit néanmoins conclure que la réaction entre les plaquettes et le sérum n'est pas instantanée, elle exige un temps mesurable, à vrai dire assez court. Citons une expérience :

Exp. XX. — Plusieurs tubes renferment 0,45 cent. cube d'EPCa et 0,05 cent. cube de sérum. On introduit une goutte de plaquettes, puis au bout de temps variables, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. On trouve ainsi

que le mélange où le plasma a été ajouté une minute et demie après les plaquettes, se coagule en trois minutes et demie. Par contre, le mélange où le plasma a été ajouté 45 secondes après les plaquettes, est encore liquide une heure plus tard. Ce n'est qu'au bout d'une heure 45' qu'une coagulation lâche et partielle s'y effectue.

On a depuis longtemps reconnu que la thrombine ne se comporte pas, à proprement parler, comme les ferments, qui peuvent modifier des quantités quasi illimitées de substance et ne semblent guère se consommer en agissant. Une dose donnée de thrombine ne peut solidifier qu'une dose donnée de fibrinogène. Aussi, par des expériences analogues à celles qui précèdent, constate-t-on que la coagulation s'opère moins facilement lorsqu'on emploie, au lieu de plasma dioxalaté dilué au cinquième, du plasma dioxalaté non dilué. Le contraste est beaucoup plus frappant si l'on a recours à la technique de l'oxalatation séparée.

Exp. XXI. — Quatre tubes ABCD contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa, 0,05 cent. cube de sérum, une goutte de plaquettes. Un quart d'heure après la confection de ces mélanges, on ajoute à A 0,5 cent. cube de plasma dioxalaté dilué (obtenu comme d'habitude par mélange de 1 vol. de plasma oxalaté avec 4 vol. de solution physiologique [oxalatee à 2 p. 1000]), à B 0,5 cent. cube de plasma dioxalaté non dilué. Quant à C et D, on les oxalate à 1 p. 1000 (par mélange avec 0,1 cent. cube d'oxalate à 0,5 p. 100), puis, 5 minutes plus tard, on les additionne respectivement de 0,5 cent. cube soit de plasma dilué, soit de plasma non dilué, oxalatés tous deux à 1 p. 1000. A se coagule en 4, B en 7, C en 8 minutes, D est encore liquide le lendemain.

Nous avons rappelé antérieurement ce fait que la thrombine du sérum issu de la coagulation d'un plasma s'affaiblit rapidement par la conservation; plus le sérum a vieilli, moins il se montre, après oxalatation à 1 p. 1000, apte à coaguler le plasma oxalaté; nous avons vu que l'atténuation est beaucoup moins constatable si le sérum n'est pas oxalaté, mais est ajouté à volume égal de plasma dioxalaté. Il est à peine besoin de dire que la thrombine issue de la réaction entre le sérum et les plaquettes se comporte de même :

Exp. XXII. — On prépare de la thrombine par mélange de sérum et de plaquettes en EPCa, et l'on évalue, à différents moments, son énergie coagulante, soit (en l'oxalant à 1 p. 1000), vis-à-vis de volume égal de plasma dilué mono-oxalaté, soit (sans l'oxalater) vis-à-vis de plasma dilué dioxalaté. Les temps de coagulation sont : suivant la technique de l'oxalatation séparée,

respectivement quatre et trente minutes pour la thrombine âgée de vingt minutes ou de deux heures; quand la thrombine est vieille de cinq heures, elle est incapable de provoquer la coagulation; suivant la technique de la dioxalation du plasma, respectivement de deux et de quatre minutes pour la thrombine âgée de deux heures (ou moins) et de dix heures. On peut donc être assuré (c'est un fait que nous utiliserons plus loin) de ce qu'un mélange où la thrombine s'est formée la veille ne se montrera plus capable, si on l'oxalate séparément, de provoquer à bref délai la coagulation de volume égal de plasma oxalaté.

La substance propre au sérum, qui réagit avec les plaquettes pour donner la thrombine, et que nous appelons le sérozyme, est thermolabile. Elle est détruite par le chauffage d'une demi-heure à 55°.

D'autre part, le sérum perd également tout pouvoir de réagir avec les plaquettes lorsqu'on le traite par une dose convenable de suspension de sulfate de baryte. Bordet et Gengou ont constaté (1) que le contact avec divers précipités minéraux, notamment CaF_2 et SO^+Ba , prive les plasmas de leur coagulabilité: les principes actifs adsorbés disparaissent du liquide ambiant; de même, ces précipités peuvent s'emparer de la thrombine du sérum. Un plasma traité par SO^+Ba , incoagulable même en milieu calcifié par ses propres moyens, se coagule par l'addition de sérum, à moins que celui-ci n'ait été lui-même traité par SO^+Ba .

Exp. XXIII. — Du sérum (obtenu comme d'habitude par dilution de plasma oxalaté limpide avec 4 vol. d'EPCa) est introduit, à dose de 1 cent. cube, dans deux tubes A et B. On laisse tomber dans B, 6 gouttes de solution physiologique, dans A, 6 gouttes de suspension assez épaisse de SO^+Ba (2). Après un contact d'une demi-heure, on centrifuge et décante; on obtient ainsi les sérums A et B.

Dans deux tubes AA et BB, contenant 0,4 cent. cube d'EPCa, on introduit 0,4 cent. cube soit de sérum A, soit de sérum B, puis une goutte de plaquettes. Un quart d'heure plus tard, on ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté; BB se coagule en trois minutes, AA est encore liquide après deux jours.

Le sérozyme étant adsorbé par SO^+Ba , le sérum n'est désormais pour les plaquettes qu'un liquide indifférent. Or, on constate que le plasma se comporte de même, c'est-à-dire qu'après traitement par SO^+Ba , il ne se coagule

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1904, p. 36. (Le plasma fluoré).

(2) Le précipité de SO^+Ba préparé par mélange de BaCl_2 avec SO^+Na^2 est lavé à plusieurs reprises, à l'aide de centrifugations et décantations successives, par de grands volumes de solution physiologique de NaCl ; on le délaie finalement dans un peu de cette solution, de manière à obtenir une suspension assez épaisse.

pas par l'addition de plaquettes lavées. On prépare aisément le plasma baryté spontanément incoagulable, en mélangeant 30 gouttes de suspension de SO^4Ba , 4 cent. cubes d'EPCa et 1 cent. cube de plasma oxalaté limpide. Après plusieurs heures de contact, on centrifuge et décante. Ajoutons que ce plasma se coagule par addition de sérum frais, et mieux encore (la coagulation est alors presque instantanée) par l'addition d'un peu de sérum et d'une goutte de plaquettes.

Le fait qu'un tel plasma reste liquide quand on y introduit des plaquettes sans sérum démontre définitivement que ces éléments sont incapables de solidifier le fibrinogène pur. Le plasma baryté représente en réalité un fibrinogène mieux débarrassé des générateurs de la thrombine que ne le sont en général les solutions dites pures de fibrinogène que l'on obtient par précipitations successives sous l'influence du sel concentré. Il est probable que, dans ces solutions, un peu de sérozyme peut prendre naissance, ce qui explique leur coagulabilité, que divers auteurs ont signalée (Morawitz, Nolf), par addition de plaquettes. Citons une expérience relative au plasma baryté :

Exp. XXIV. — Dans trois tubes ABC on introduit 1 cent. cube de plasma baryté. On ajoute au tube A 3 gouttes de suspension de plaquettes, au tube B 0,2 cent. cube de sérum (fraîchement obtenu) provenant de plasma oxalaté limpide recalcifé par 4 vol. d'EPCa, au tube C même dose du même sérum mais qui au préalable a été additionné d'une trace de plaquettes. A ne se coagule pas, B se coagule en dix-sept minutes, C en moins d'une minute.

D'autre part, le sérozyme n'est pas absorbé par des globules sensibilisés, de telle sorte qu'il ne paraît point devoir être identifié avec l'alexine. Le sérum (obtenu comme d'habitude) mélangé à un excès de globules de chèvre sensibilisés par du sérum de lapin antichèvre (chauffé au préalable à 56 degrés), puis séparé par centrifugation, produit encore de la thrombine lorsqu'on l'additionne de plaquettes.

Le mélange sérum-plaquettes, qui coagule presque instantanément le plasma baryté, agit de même, ainsi qu'il faut s'y attendre, vis-à-vis de divers liquides contenant du fibrinogène, tels que le liquide surnageant obtenu par centrifugation de l'exsudat péritonéal leucocytaire dont nous avons parlé antérieurement, ou bien encore le liquide surnageant (resalé et recalcifé) que l'on décante après centrifugation de plasma

oxalaté traité par l'eau distillée et CO_2 , et dont il a été question plus haut. Ces deux liquides, nous l'avons vu, sont quasi-incoagulables spontanément, mais, à vrai dire, peuvent se coaguler par addition de plaquettes, ce qui démontre que du sérozyme peut y prendre naissance. Nous jugeons inutile d'insister sur le détail de ces expériences. Ajoutons néanmoins, ici, que le sédiment séparé par centrifugation de plasma oxalaté limpide additionné de 9 volumes d'eau distillée et traité par CO_2 se comporte comme s'il contenait quelques plaquettes, en ce sens qu'additionné de sérum, il développe de la thrombine. Ceci vient corroborer l'idée, exprimée dans notre paragraphe I^{er}, que le plasma oxalaté, même très limpide, contient encore des traces de plaquettes auxquelles il doit sa coagulabilité par recalcification, et dont précisément on peut le priver par l'action combinée de l'eau distillée et de CO_2 .

Le sérozyme (ou les substances dont il peut dériver) est-il largement répandu dans les liquides de l'organisme? Nous n'avons examiné à cet égard que l'humeur aqueuse et l'exsudat péritonéal normal. L'humeur aqueuse n'en contient pas; l'exsudat péritonéal en renferme, mais beaucoup moins que le sérum.

Nous avons vu antérieurement que l'exsudat péritonéal leucocytaire obtenu chez le lapin, ou de préférence chez le cobaye, par injection de solution physiologique ou de bouillon se coagule paresseusement et peut même fournir, par centrifugation, un liquide surnageant incoagulable, mais qui se prend en masse par addition de plaquettes, celles-ci accélérant d'ailleurs beaucoup, même à dose assez faible, la prise en caillot de l'exsudat total, d'où la conclusion que les leucocytes sont inférieurs aux plaquettes en ce qui concerne la production de la thrombine. Cette conclusion est confirmée par l'étude comparée de l'aptitude des plaquettes et des leucocytes à fournir la thrombine par mélange avec le sérum. Comme beaucoup d'autres cellules, les leucocytes lavés dont on obtient une suspension aux dépens d'un exsudat péritonéal libèrent de la thrombine au contact du sérum. Mais les suspensions de plaquettes nous ont paru, à cet égard, beaucoup plus actives: elles agissent encore puissamment, à des dilutions extrêmes, ce qui n'est pas le cas pour l'émulsion leucocytaire. Nous avons l'impres-

sion que le cytozyme des leucocytes est moins utilisable pour la coagulation que ne l'est celui des plaquettes, sans doute parce qu'il reste davantage confiné dans la trame de l'élément cellulaire; s'il n'en était pas ainsi, on ne concevrait guère pourquoi l'exsudat péritonéal, très riche en leucocytes, se coagule plus vite par l'addition de plaquettes. Cependant le cytozyme des leucocytes peut être utilisé dans une certaine mesure, puisque cet exsudat, bien que lentement coagulable, se prend néanmoins en masse plus vite que le même liquide débarrassé des cellules, et que, d'autre part, sous l'influence d'une addition de sérum, l'exsudat se coagule aussi plus vite lorsqu'il contient encore ses leucocytes que lorsqu'on l'en a dépouillé. Ces considérations, rappelons-le, sont en harmonie avec celles que suggère la coagulation du sang d'oiseau qui renferme des leucocytes, mais point de plaquettes.

Les auteurs qui se sont occupés des plaquettes croyaient que les propriétés de ces éléments ne résistaient guère au chauffage; il n'en est rien; le principe actif peut, sans dommage, être porté à 100 degrés. Nous l'avons vu plus haut, les plaquettes chauffées un quart d'heure à 100 degrés, ou même qui ont subi, à quelques jours d'intervalle, trois chauffages pendant cinq à dix minutes à cette température et ont été ainsi stérilisées, accélèrent encore fortement la coagulation du plasma dilué recalcifié. De même, elles ont gardé toute leur aptitude première à former la thrombine avec le concours du sérum. Le sérozyme n'est visiblement atteint que si l'on chauffe les plaquettes à 120 degrés dans l'autoclave :

Exp. XXV. — Quatre tubes A, B, C, D contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum, obtenu la veille par dilution de plasma oxalaté limpide avec 4 volumes d'EPCa. On laisse tomber en A une goutte de suspension de plaquettes non chauffée, en B une goutte de suspension chauffée 30 minutes à 65 degrés, en C, une goutte de suspension chauffée 15 minutes à 100 degrés, en D une goutte de suspension chauffée 15 minutes à 120 degrés. Un quart d'heure plus tard, on ajoute à tous les tubes 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. A, B se coagulent en 3 minutes, C en 3 min. 10 secondes, D est encore liquide au bout de plusieurs heures.

Le liquide transparent que l'on obtient en centrifugeant une suspension stérilisée est parfaitement actif, même s'il a été conservé pendant trois mois en tube scellé.

Exp. XXVI. — Trois tubes A, B, C contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa, 0,1 cent. cube de sérum; on ajoute à A une goutte de l'extrait limpide de

plaquettes stérile conservé pendant trois mois, à B une goutte de plaquettes fraîches. On introduit ensuite, dans les trois tubes, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. A se coagule en 2 minutes, B en 3, C est encore liquide le lendemain.

La diffusion du cytozème hors des plaquettes se fait d'ailleurs à froid assez rapidement : une suspension de plaquettes centrifugées quarante-huit heures après sa préparation fournit un liquide surnageant qui réagit fort bien avec le sérum pour donner de la thrombine.

Jusqu'ici nous avons toujours employé du sérum pour provoquer sur les plaquettes la réaction qui donne naissance à la thrombine. Mais on doit évidemment se demander si le principe du sérum qui réagit avec les plaquettes n'existe pas déjà, avec les mêmes propriétés, dans le plasma oxalaté que l'on vient de recalcifier et qui n'a pas encore eu le temps de subir les modifications dont le terme est la coagulation. L'expérience plaide pour la négative. Un tel plasma ne se comporte pas, lorsqu'on y ajoute des plaquettes, comme le sérum ; pour trouver de la thrombine dans le mélange, il faut attendre un certain temps, à la vérité pas très long, car on sait qu'un mélange de plasma recalcifié et de plaquettes se coagule vite et équivaut donc bientôt à du sérum. Mais dans le mélange sérum-plaquettes, l'apparition de thrombine est plus prompte ; elle peut, nous l'avons vu, se produire en moins de deux minutes. En opérant soigneusement, on peut comparer, au point de vue du temps qu'exige la production de la thrombine, un mélange de plaquettes et de plasma dilué que l'on vient de recalcifier, avec un mélange identique, sauf qu'il contient du sérum issu de la coagulation antérieure d'un plasma de même composition.

Exp. XXVII. — Du sérum a été obtenu la veille par mélange de 1 cent. cube de plasma oxalaté limpide avec 4 volumes d'EPCa. D'autre part, au moment même de l'expérience, on prépare un mélange identique. On a donc un sérum et un plasma tout récent, de même composition initiale. Ces deux liquides sont dilués de 9 volumes d'EPCa. Aussi rapidement que possible, on distribue alors ces liquides, à dose de 0,5 cent. cube, dans des tubes où on laisse tomber une goutte de plaquettes. On laisse ce contact entre les liquides et les plaquettes se prolonger pendant des temps variables et exactement mesurés, puis l'on ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. On trouve ainsi que le mélange contenant du sérum et où le contact de celui-ci avec les plaquettes a duré 1 min. 45 secondes se prend en bloc en 4 min. 45 secondes, tandis que le mélange renfermant du plasma et où le contact de celui-ci avec les plaquettes a duré 3 min. 10 secondes ne se coagule pas. Celui où le contact plasma-plaquettes s'est prolongé 3 min. 20 secondes se coagule, mais assez lentement (18 minutes) ; celui où ce contact a

été de 4 minutes se coagule en 5 minutes. Des témoins établissent, bien entendu, que la coagulation ne survient pas en l'absence de plaquettes.

Il semble résulter nettement de cette expérience (inutile de dire que d'autres essais analogues ont donné des résultats concordants) que le plasma recalcifié tout récemment préparé contient non pas le sérozyme actif, mais seulement une substance mère dont celui-ci peut dériver (1). La première phase de la coagulation se signalerait donc par la transformation d'un « prosérozyme » en sérozyme apte à réagir avec le cytozyme. Il se pourrait aussi, à vrai dire, que cette première phase se signalât par la disparition d'une substance antagoniste empêchant le sérozyme d'entrer en activité; d'après cette hypothèse, le sérozyme existerait dans le plasma, mais ne pourrait agir qu'au bout d'un certain temps.

Nous reviendrons d'ailleurs sur ce point à propos de la production de thrombine dans les mélanges de sérum et de peptone.

Les matériaux aux dépens desquels le sérozyme naît dans le plasma sont, comme le sérozyme lui-même, peu résistants au chauffage. Le plasma oxalaté limpide, chauffé à 56 degrés, puis dilué et recalcifié, est incapable, comme le sérum chauffé à cette température, de former de la thrombine en présence de plaquettes.

Exp. XXVIII. — Du plasma oxalaté très limpide est chauffé une demi-heure à 56 degrés; le fibrinogène s'y précipite en flocons. On l'additionne ensuite de 4 volumes d'EPCa. En même temps, on dilue semblablement du plasma identique, sauf qu'il n'a pas été chauffé. Cette seconde dilution se coagule en une heure environ; on obtient ainsi un sérum dont une portion est chauffée une demi-heure à 56 degrés.

On introduit ensuite dans un tube A 0,2 cent. cube du plasma chauffé dilué,

(1) C'est pourquoi nous avons choisi, pour désigner la substance du sérum qui réagit avec les plaquettes, le terme de sérozyme et non celui de plasmozyme. Morawitz, Fuld et Spiro avaient montré que le suc de tissus (cytozyme) réagit avec le sérum pour donner la thrombine. A vrai dire, il s'agit ici de plaquettes, mais nous montrons plus loin que le cytozyme des plaquettes est très vraisemblablement identique à celui des tissus. Or, Fuld et Spiro admettent que le principe du sérum qui réagit avec les tissus pré-existe dans le plasma, ils l'appellent plasmozyme; Morawitz, qui partage cette opinion, l'appelle thrombogène. En conséquence, à part cette restriction que, d'après nous, le sérozyme n'existe pas dans le plasma au même état que dans le sérum, les termes de sérozyme, plasmozyme et thrombogène sont synonymes.

dans un tube B même dose du sérum non chauffé dont il vient d'être question, et dans un tube C même dose de ce sérum chauffé. On ajoute partout 0,3 cent. cube d'EPCa, une goutte de plaquettes, puis, 20 minutes plus tard, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation s'effectue en 2 minutes dans B; les mélanges A et C sont encore liquides le lendemain.

L'expérience donne le même résultat si, au lieu de chauffer le plasma et de le diluer ensuite, on le dilue d'abord et le chauffe immédiatement après à 56 degrés.

Considérons maintenant plus attentivement la réaction qui s'établit entre les plaquettes et le sérum, c'est-à-dire entre le cytozyme et le sérozyme, pour donner de la thrombine. L'une des substances agit-elle sur l'autre à la façon d'un ferment, ou bien se consomme-t-elle par le fait même qu'elle est entrée en réaction? Par exemple, un volume donné de sérum pourra-t-il, après s'être trouvé en contact avec une dose notable de plaquettes, fournir encore de la thrombine lorsqu'on lui fait rencontrer ensuite une dose nouvelle de ces mêmes éléments? Le premier contact ne l'a-t-il pas épuisé de son sérozyme? Le problème du mode de réaction des générateurs de la thrombine a déjà préoccupé les chercheurs; nous rappellerons notamment une expérience due à Nolf: il y a plus de thrombine dans le sérum issu de sang complet que dans celui qui provient de plasma limpide, mais on constate d'autre part que le second sérum est plus apte que le premier à fournir de la thrombine par mélange avec de l'extrait de rate. D'après Nolf, il y a, dans la coagulation du sang complet, consommation de thrombogène, résultant, suivant toute vraisemblance, d'une sécrétion par les leucocytes du sang d'une quantité plus ou moins considérable de thrombozyme qui s'unit pendant la coagulation à l'excès de thrombogène du plasma. L'expérience est intéressante, mais ne présente pas toute la rigueur voulue, car elle est trop complexe, et c'est pourquoi l'interprétation de l'auteur n'est que vraisemblable. Il convient d'éliminer les facteurs étrangers, notamment de mettre hors de cause le fibrinogène et d'éviter ainsi la formation d'un caillot au cours de la réaction; c'est d'autant plus nécessaire que, d'après certains auteurs, particulièrement Nolf, le fibrinogène peut intervenir dans la production de la thrombine. Il y a donc lieu de mettre en présence uniquement les deux facteurs de la réaction, le sérozyme sous forme de sérum, le

cytozyme sous forme de plaquettes, sans mélange d'autres éléments cellulaires. Il faut mettre en œuvre, en d'autres termes, une technique semblable à celle qui sert à démontrer la fixation des anticorps sur les antigènes, des sensibilisatrices sur les globules rouges, par exemple. L'expérience consiste donc à mélanger à une suspension épaisse de plaquettes, une dose modérée de sérum. La formation de thrombine qui s'effectue alors consomme-t-elle le sérozyme ? S'il en est ainsi, le sérum séparé le lendemain par centrifugation doit se montrer incapable de former de nouvelle thrombine par contact avec de nouvelles plaquettes. Tel est bien le résultat de l'expérience, dans laquelle on met à profit le fait qu'une thrombine vieillie n'est plus capable de coaguler rapidement le plasma oxalaté lorsqu'on emploie la technique de l'oxalatation séparée :

Exp. XXIX. — Du sérum a été comme d'habitude obtenu la veille par dilution de 1 vol. de plasma limpide dans 4 vol. d'EPCa. On en introduit 0,4 cent. cube dans 2 tubes A et B, et 0,2 cent. cube dans AA et BB. On ajoute aux quatre tubes de l'EPCa (0,6 cent. cube dans A et B, 0,8 cent. cube dans AA et BB) de façon à ce que partout le volume total soit de 1 cent. cube. On laisse tomber ensuite dans B et BB, deux gouttes de solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000 et dans A et AA, deux gouttes d'une suspension épaisse de plaquettes dans cette même solution. Le lendemain matin, on centrifuge les tubes qui contiennent des plaquettes et où de la thrombine a pu se produire, et l'on décante les liquides surnageants A et AA.

Chacun des quatre liquides est ensuite distribué dans deux tubes, à dose de 0,45 cent. cube.

Le premier des deux tubes provenant soit de A, soit de B, soit de AA, soit de BB, est additionné d'une goutte de suspension (plus diluée que la précédente) de plaquettes; le second de chaque groupe de deux tubes est additionné d'une goutte de la solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000. Un quart d'heure plus tard, les huit tubes sont additionnés de 0,1 cent. cube de solution d'oxalate à 0,5 p. 100 (ils sont donc oxalatés à environ 1 p. 1000), puis, 5 minutes après, de 0,5 cent. cube de plasma dilué oxalaté à 1 p. 1000 (obtenu par mélange de 1 p. de plasma oxalaté avec 4 p. de solution physiologique oxalatée à 1 p. 1000). La coagulation survient en 6 minutes dans le tube auquel on vient d'ajouter des plaquettes et renfermant du liquide provenant de B, en 12 minutes dans le tube à plaquettes contenant du liquide de BB.

Les mélanges provenant de A et de AA, avec ou sans addition récente de plaquettes, ne se coagulent qu'au bout de quatre heures environ, les autres tardent encore davantage, ou même ne se coagulent que fort incomplètement.

On voit clairement comment les choses se sont passées : En A et AA, il s'est formé de la thrombine, et celle-ci conservée jusqu'au lendemain ne peut plus provoquer qu'une coagulation lente lorsqu'on l'oxalate à 1 p. 1000 et qu'on la mélange au plasma oxalaté.

Corrélativement à cette formation de thrombine, le sérum contenu dans A

et AA, en réagissant avec les plaquettes, a perdu l'aptitude à réagir avec de nouvelles plaquettes. Dans B et BB, au contraire, pas de plaquettes au début, pas de formation de thrombine; le sérum que ces tubes recèlent est encore parfaitement capable, le lendemain, de réagir avec des plaquettes pour donner une thrombine qui, étant toute fraîche, provoque très rapidement (6 et 12 minutes suivant la dose de sérum) la coagulation du plasma oxalaté.

Il résulte immédiatement de cette expérience que le sérum issu de la coagulation de plasma oxalaté et recalcifié riche en plaquettes, sérum abondamment pourvu de thrombine, doit se montrer peu apte à réagir avec la suspension de plaquettes, pour la raison précisément que le sérozyme a dû être consommé par les plaquettes lors de la coagulation. C'est ce que l'expérience vérifie; il est aisé de comparer de tels sérums avec celui qui dérive de plasma limpide :

EXP. XXX. — On dispose de plasma oxalaté A qu'une centrifugation modérée a débarrassé des éléments cellulaires sauf des plaquettes, et de plasma limpide énergiquement centrifugé B. A une portion de celui-ci, on restitue des plaquettes (par addition d'un peu de suspension épaisse de plaquettes lavées), de façon à obtenir un liquide AA plus trouble que ne l'est le plasma modérément centrifugé. Chacun de ces trois plasmas est additionné de 4 vol. d'EPCa. Les sérums obtenus A, B, AA, sont conservés jusqu'au lendemain, puis, pour chacun d'eux, on prépare quatre dilutions dans l'EPCa, l'une au cinquième, la seconde au dixième, la troisième au vingtième, la quatrième au cinquantième.

On évalue tout d'abord l'énergie coagulante de chacune des trois dilutions au cinquième, vis-à-vis de volume égal de plasma dilué dioxalaté. On trouve que le mélange contenant le sérum A se coagule en 9 heures environ, celui renfermant le sérum AA en 5 heures; celui à base de sérum B est encore liquide après 10 heures, on le trouve coagulé le lendemain. Ce résultat corrobore la notion que les sérums dérivant de plasmas à plaquettes sont plus riches en thrombine.

D'autre part, on répartit dans des tubes 0,5 cent. cube de chacune des dilutions de chacun des trois sérums; on ajoute une goutte de suspension de plaquettes, puis un quart d'heure plus tard on introduit 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Voici les temps de coagulation observés :

DILUTION AU. . . .	1/5	1/10	1/20	1/50
De sérum A . . .	1 h. 15 min.	∞ (1)	∞	∞
De sérum AA . . .	1 h. 30 min.	∞	∞	∞
De sérum B . . .	3-4 minutes.	3-4 minutes.	3-4 minutes.	Coagulation le lendemain.

(1) Le signe ∞ signifie que le mélange reste indéfiniment liquide.

On voit combien est faible, dans le cas de sérum issu de plasma à plaquettes, le pouvoir de réagir avec ces éléments. Le sérum provenant de la coagulation de sang complet se comporte de même. L'expérience montre toutefois que ce dernier sérum possède encore, mais à un assez faible degré, le pouvoir de former de nouvelle thrombine en présence de plaquettes. La dose de sérozyme que le sang peut livrer est donc un peu supérieure à celle qu'exige la saturation des affinités, pour ce principe actif, des éléments cellulaires sanguins.

Il est un phénomène sur lequel Bordet et Gengou (1) ont insisté et que nos expériences sur les plaquettes permettent d'expliquer clairement. C'est le phénomène dit de « l'excito-production ». Si l'on dilue par 4 volumes d'eau distillée du plasma salé à 5 p. 100, la coagulation s'effectue, on le sait, au bout d'un temps assez notable, une demi-heure par exemple. Mais elle est considérablement accélérée si, immédiatement après dilution, le plasma salé est additionné d'un peu de sérum issu de la coagulation antérieure d'un plasma dilué de même composition. Et, chose curieuse, on trouve que la prompte coagulation ainsi déchaînée n'est pas en réalité passive, c'est-à-dire due uniquement à la thrombine propre au sérum ajouté, car elle se signale par une abondante néoformation de thrombine. Le sérum n'agit pas essentiellement grâce à la thrombine qu'il apporte, mais parce qu'il excite, au sein du plasma et aux dépens des matériaux appartenant à celui-ci, la production de la thrombine qui, sans son intervention, n'aurait apparu que notablement plus tard pour réaliser la coagulation spontanée. Le chauffage à 56 degrés, enlevant au sérum ce pouvoir excito-producteur, supprime sa propriété d'accélérer la coagulation du plasma salé dilué; d'autre part, ce pouvoir résiste mieux que la thrombine à la conservation à la température ordinaire.

Les recherches de Bordet et Gengou n'avaient pu élucider complètement ce phénomène; Nolf l'a interprété en attribuant au sérum un rôle thromboplastique analogue à celui que joue le contact avec les corps solides. L'explication exacte en est désormais aisée: Le plasma salé, même bien centrifugé, contient un peu de cytozyme que le sel a extrait des plaquettes. D'autre

(1) Ces *Annales*, 1904, p. 103.

part, le sérum issu de la coagulation contient un excès de sérozyme. Si donc, à du plasma salé qu'on vient de diluer, on ajoute du sérum, la rencontre s'effectue entre les deux principes, de la thrombine se forme et la coagulation s'opère à bref délai.

Pour faire l'analyse expérimentale du phénomène d'excito-production, il est commode de se servir de plasma oxalaté qui, modérément centrifugé, n'a pas été complètement débarrassé de ses plaquettes et qui (comme le plasma salé) recèle le cytozyme en quantité très suffisante. Le plasma est chauffé à 56 degrés, puis recalcifié; ainsi traité, il est incoagulable pour deux raisons : le chauffage non seulement a altéré le fibrinogène, mais encore, conformément à ce que nous avons vu plus haut, a enlevé au plasma l'aptitude à produire le sérozyme indispensable à la formation de la thrombine. Mais, nous le savons, le cytozyme résiste parfaitement au chauffage. L'addition d'un peu de sérum au plasma chauffé y fera, en conséquence, naître de la thrombine. Le mélange restera fluide, puisque le fibrinogène est altéré, mais se montrera capable de solidifier rapidement le plasma dioxalaté.

Exp. XXXI. — Du plasma oxalaté contenant des plaquettes est chauffé une demi-heure à 55°8. On vérifie tout d'abord que le mélange d'un tel plasma avec 4 vol. d'EPCa non seulement ne se coagule pas, mais encore ne se montre, à aucun moment, capable de coaguler volume égal de plasma dilué dioxalaté.

Cela étant établi, on introduit dans un tube A 0,2 cent. cube de plasma chauffé et 0,8 cent. cube d'EPCa, et dans un tube B 1 cent. cube d'EPCa. On ajoute aux deux tubes 0,2 cent. cube de sérum, obtenu comme d'habitude la veille par dilution de plasma oxalaté limpide avec 4 vol. d'EPCa. Quarante minutes plus tard, on additionne les deux mélanges de 1 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Le mélange A se coagule en quatre minutes, le mélange B est encore liquide le lendemain.

L'expérience donne le même résultat si, au lieu de chauffer d'abord le plasma et de le diluer ensuite, on le chauffe immédiatement après dilution par quatre volumes d'EPCa.

L'expérience telle qu'elle est réalisée ci-dessus permet aussi de démontrer que le plasma oxalaté, lorsqu'il est soigneusement débarrassé des plaquettes par la centrifugation, ne contient que des traces de cytozyme trop faibles pour permettre la formation de thrombine en quantité notable :

Exp. XXXII. — On répète l'expérience ci-dessus, en préparant en outre un mélange C constitué comme suit : Du plasma oxalaté bien dépourvu de

plaquettes, est chauffé une demi-heure à 55°8; on en prend 0,2 cent. cube qu'on additionne de 0,8 cent. cube d'EPCa et de 0,2 cent. cube de sérum. Quarante minutes plus tard, on introduit 1 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Le mélange est encore liquide le lendemain.

Les conditions réalisées dans l'expérience XXXI sont l'image suffisamment fidèle de celles qui président au phénomène d'excito-production signalé par Bordet et Gengou, lequel en conséquence n'offre plus rien de mystérieux. Ajoutons que d'après ces auteurs, le contact avec un corps mouillable tel que le verre n'est pas nécessaire à la production de thrombine, sous l'influence du sérum, au sein du plasma. De même, nous pensons que ce contact n'intervient pas dans la réaction entre le sérozyme et le cytozyme des plaquettes.

§ III. — LE CYTOZYME DU SUC DE MUSCLES.

Comme nous l'avons rappelé, Morawitz a vu que le suc de tissus développe de la thrombine lorsqu'en milieu calcifié on le mélange à du sérum. Ce fait sert de base à la théorie d'après laquelle la thrombine dérive de deux générateurs distincts.

On admettait que le principe actif de l'extrait d'organes (cytozyme) ne résiste pas à l'action des températures élevées. Nous avons constaté le contraire en opérant sur l'extrait de muscles, lequel à vrai dire devient presque inactif lorsqu'on le chauffe à 120 degrés, mais garde ses propriétés lorsqu'on l'expose pendant un quart d'heure à la température de 100 degrés. Il se comporte donc comme la suspension de plaquettes, en ce sens que, même chauffé, il accélère la coagulation du plasma oxalaté limpide que l'on vient de recalcifier, et d'autre part donne naissance à de la thrombine lorsqu'on l'additionne de sérum.

Exp. XXXIII. — Un fragment de muscle de lapin est broyé et additionné de solution physiologique contenant 0,5 p. 1.000 d'oxalate. La suspension très trouble ainsi obtenue est passée sur toile métallique à mailles fines. Une portion du liquide est conservée telle quelle, une autre est chauffée le lendemain pendant un quart d'heure à 100 degrés, en même temps qu'une suspension de plaquettes de lapin et un extrait de muscle de bœuf préparé comme l'a été l'extrait de muscle de lapin.

On verse dans huit tubes 0,3 cent. cube de plasma oxalaté bien limpide et l'on ajoute 1,2 cent. cube d'EPCa. Immédiatement après, on laisse tomber

dans l'un des tubes (a) une goutte de suspension de plaquettes non chauffée, dans un second tube une goutte de plaquettes chauffée (b). De même, quatre tubes reçoivent soit de l'extrait non chauffé de muscle de lapin (c), soit cet extrait chauffé (d), soit de l'extrait de muscle de bœuf non chauffé (e), soit ce même extrait chauffé (f). Aux deux tubes restants g et h, on n'ajoute rien. Résultat : dans g et h la coagulation s'opère en 22 à 26 minutes (1), dans a en 6', dans b en 7', dans c en 4', dans d en 3', dans e en 14', dans f en 13'.

On constate, soit dit en passant, que le muscle de bœuf est nettement inférieur au muscle de lapin au point de vue de l'accélération imprimée à la coagulation du plasma oxalaté recalcifié; il agit toutefois nettement.

Exp. XXXIV. — Cinq tubes contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum obtenu comme d'habitude la veille par dilution de 1 vol. de plasma oxalaté limpide avec 4 vol. d'EPCa. Au tube 1 on n'ajoute rien; dans les tubes 2, 3, 4, 5, on laisse tomber une goutte, respectivement de plaquettes non chauffées, de plaquettes chauffées à 100 degrés, d'extrait non chauffé de muscle de lapin, de ce même extrait chauffé à 100 degrés. Un quart d'heure plus tard, on ajoute aux mélanges 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Résultat : 1 est encore liquide le lendemain; la coagulation s'opère en 2 à 3 minutes dans les autres tubes.

Nous avons vu plus haut que le chauffage vers 56 degrés enlève au sérum (ou au plasma) le pouvoir de réagir avec les plaquettes pour donner de la thrombine. Il en est de même pour ce qui concerne la réaction avec le suc de muscles (2) :

Exp. XXXV. — On établit tout d'abord qu'un mélange de 0,3 cent. cube d'EPCa et de 0,2 cent. cube de sérum non chauffé, auquel on ajoute volume égal (0,5 cent. cube) de plasma dilué dioxalaté, ne se coagule pas (il est encore liquide le lendemain). Il en est de même, cela va de soi, d'un mélange semblable, sauf que le sérum non chauffé y est remplacé par 0,2 cent. cube de ce même sérum préalablement chauffé une demi-heure à 55°4.

Cela étant établi, on verse dans six tubes 0,3 cent. cube d'EPCa et 0,2 cent. cube de sérum, soit non chauffé (A, B, C), soit qui a été chauffé une demi-heure à 55°4 (D, E, F). On laisse tomber en A et D une goutte de plaquettes, en B et E, une goutte d'extrait de muscles de lapin, en C et F une goutte

(1) Ce temps de coagulation du plasma limpide dilué et recalcifié est relativement court. Cela tient à ce que la température du laboratoire était fort élevée (23°) le jour où cette expérience a été réalisée.

(2) Nous ne sommes donc pas d'accord avec les auteurs (Blaisot notamment) d'après lesquels le plasma oxalaté chauffé à 56 degrés se comporte comme s'il contenait encore du thrombogène. On le sait, le thrombogène correspond à notre sérozyme. Or, nous avons constaté que si l'on ajoute à 0,2 cent. cube de plasma oxalaté (chauffé au préalable une demi-heure à 55°8) 0,8 cent. cube d'EPCa et un peu d'extrait de muscle, il ne se forme pas de thrombine dans le mélange.

d'extrait de muscle de bœuf, puis, 20 minutes plus tard, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation s'opère en une et demie à deux et demie minutes dans les tubes A, B, C; les mélanges D, E, F sont encore liquides le lendemain.

Dans les expériences qui précèdent, l'extrait de muscle se comporte exactement comme la suspension de plaquettes. Le cytozyme de l'extrait est-il entièrement identique à celui des plaquettes? S'il en est ainsi, on doit prévoir que du sérum dépouillé de son sérozyme par contact préalable avec des plaquettes, se montrera inactif non seulement à l'égard de nouvelles plaquettes (ce que nous savons déjà), mais aussi vis-à-vis d'extrait de muscle, et qu'inversement le traitement par le suc de muscle doit enlever au sérum son aptitude à réagir avec les plaquettes. C'est bien dans ce sens que l'expérience répond :

Exp. XXXVI. — Trois tubes A, B, C contiennent 0,9 cent. cube d'EPCa et 0,6 cent. cube de sérum. On ajoute à A trois gouttes de suspension assez épaisse de plaquettes lavées, à B même quantité d'extrait de muscle de lapin, à C même dose de solution physiologique oxalatée à 5 p. 1 000 (comme le sont la suspension de plaquettes et l'extrait). Le lendemain, on centrifuge A et B et décante les liquides surnageants. Chacun des liquides A, B, C est alors réparti, à dose de 0,45 cent. cube dans trois tubes qu'on additionne respectivement d'une goutte, soit de plaquettes, soit d'extrait de muscle, soit de solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1 000. Vingt minutes plus tard, on oxalate les mélanges à 1 p. 1 000 (par addition de 0,1 cent. cube d'oxalate à 0,5 p. 100), et au bout de dix minutes, on les additionne de 0,5 cent. cube de plasma dilué oxalaté à 1 pour 1 000 (obtenu par mélange de 1 vol. de plasma oxalaté limpide avec 4 volumes de solution physiologique oxalatée à 1 pour 1 000).

Aucun des mélanges renfermant le liquide A ou le liquide B ne se coagule rapidement; ils se solidifient au bout de trois à quatre heures seulement, sous l'influence de la thrombine qui s'y est produite la veille et dont l'énergie s'est beaucoup affaiblie par la conservation. L'addition récente d'une goutte de plaquettes ou d'une goutte d'extrait n'y a déterminé aucune apparition de thrombine, ce qui démontre que le sérozyme a disparu grâce au premier contact, réalisé le jour précédent, soit avec les plaquettes, soit avec l'extrait. Au contraire, le sérozyme s'est maintenu intact dans le liquide C. En effet, les deux mélanges contenant ce liquide, et qui viennent de recevoir soit une goutte de plaquettes, soit une goutte d'extrait, se coagulent en 4-5 minutes. L'expérience montre qu'un sérum épuisé

par des plaquettes est devenu inactif à l'égard d'extrait, aussi bien qu'à l'égard de plaquettes, et vice-versa.

Dans le même ordre d'idées, nous avons éprouvé vis-à-vis de l'extrait de muscle, les sérums dont il est question dans l'expérience XXX, et qui, provenant de plasmas riches en plaquettes, ne possédaient, comparativement à du sérum issu de plasma limpide, qu'une aptitude médiocre à développer de la thrombine en présence de plaquettes. On trouve que ces sérums se montrent également peu aptes à réagir avec l'extrait de muscle :

Exp. XXXVII. — On reprend les sérums A, B, AA de l'expérience XXX, et qui proviennent respectivement de deux plasmas riches en plaquettes (A, AA) ou d'un plasma limpide (B). On dilue ces sérums au dixième (dans EPCa) : chacune de ces dilutions est introduite à dose de 0,5 cent. cube dans trois tubes A, AA, B ; on ajoute une goutte d'extrait de muscle, et vingt minutes plus tard, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. A est encore liquide après 4 heures (on le trouve coagulé le lendemain) ; B se coagule en 4 minutes, A A en 4 heures environ.

Les faits que nous venons de citer autorisent, nous semble-t-il, à identifier le principe actif des plaquettes avec le principe correspondant de l'extrait de muscle ; ces deux principes peuvent être confondus sous la dénomination commune de cytozyme.

SPÉCIFICITÉ D'ACTION DU SUC DE TISSUS. — D'après les auteurs qui se sont occupés de cette question, c'est une loi assez générale que le suc de tissu venant d'une espèce animale déterminée se montre spécialement actif à l'égard du plasma provenant de la même espèce ou d'une espèce voisine. Delezenne avait observé par exemple que le plasma d'oie se coagule plus vite sous l'influence d'extrait de tissu d'oie que sous l'action d'extrait de tissu de mammifères. C'est particulièrement à L. Loeb que l'on doit de nombreux renseignements concernant l'adaptation spécifique des sucs de tissus aux plasmas d'espèce identique. Hewlett, Fuld, Nolf, Muraschew, ont contribué aussi à l'étude de cette question, laquelle est assez complexe, car à côté de la spécificité possible du cytozyme (c'est-à-dire de son aptitude plus ou moins grande à réagir avec les sérozymes de même espèce ou d'espèces différentes) intervient aussi la spécificité éventuelle de la thrombine née de cette réaction (c'est-à-dire

son aptitude plus ou moins marquée à provoquer la prise en caillot de tel ou tel fibrinogène). Il semble bien acquis, d'après les recherches de Bordet et Gengou sur les sérums anticoagulants, que les thrombines provenant d'espèces animales différentes ne sont pas chimiquement tout à fait identiques les unes aux autres, ce qui ne signifie nullement qu'elles soient incapables de coaguler des fibrinogènes venant d'espèces animales autres que celles dont elles-mêmes dérivent. La spécificité d'action des thrombines ne semble pas, en effet, être très stricte; ainsi, du sérum de poule provoque sans difficulté la coagulation de plasma oxalaté de lapin.

Mais l'expérience permet des combinaisons telles, qu'*a priori* il peut être assez difficile de dire à quelle espèce animale appartient la thrombine que l'on étudie. Trois espèces animales en effet peuvent intervenir dans une seule et même coagulation. Nous pouvons évidemment faire réagir un sérum d'espèce A sur des plaquettes ou du suc de tissu d'espèce B, et éprouver ensuite l'énergie coagulante du mélange sur un plasma d'espèce C. Dans de pareilles conditions, la thrombine en jeu appartient-elle à l'espèce A ou à l'espèce B? S'identifie-t-elle avec l'une ou l'autre des thrombines qu'on obtiendrait soit en mélangeant du suc de A avec du sérum de A, soit en ajoutant à du sérum de B, du suc de B? Des recherches dans ce sens jetteraient sans doute plus de lumière sur le mécanisme intime de la réaction qui s'établit entre le cytozème et le sérozyme; peut-être aurait-on recours utilement, à ce propos, aux sérums anticoagulants spécifiques obtenus par immunisation contre l'un ou l'autre des principes actifs.

Quoi qu'il en soit, réservant de tels essais pour une étude ultérieure, nous nous bornerons aujourd'hui à énumérer sans commentaires quelques constatations recueillies au cours de nos expériences :

Du plasma de poule qui se coagule sous l'influence de suc de muscle de poule donne un sérum qui coagule aisément le plasma oxalaté de lapin. Le sérum de cobaye fournit une thrombine très active (à l'égard de plasma de lapin) lorsqu'on le mélange à des plaquettes de lapin. Le plasma oxalaté de lapin se coagule aisément sous l'influence d'un mélange de sérum de lapin avec du muscle de bœuf ou d'un mélange de sérum de

bœuf, soit avec des plaquettes de lapin, soit avec du muscle de bœuf. Mais, chose assez curieuse, le mélange de sérum de lapin et de plaquettes de lapin, ou bien encore le mélange de sérum de lapin et de muscle de bœuf, lesquels coagulent facilement le plasma dioxalaté de lapin, ne coagulent que très lentement et très péniblement le plasma dioxalaté de bœuf. Celui-ci pourtant se coagule très vite sous l'influence d'un mélange de sérum de bœuf avec des plaquettes de lapin, ou bien encore d'un mélange de sérum de bœuf avec du muscle de bœuf. Nous avons vu plus haut que le muscle de bœuf accélère assez nettement la coagulation du plasma oxalaté de lapin que l'on vient de recalcifier.

§ IV. — LE CYTOZYME DE LA PEPTONE.

Le plasma peptoné spontanément incoagulable qu'on obtient par saignée des animaux auxquels on vient d'injecter de la peptone a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. Nous ne comptons pas le soumettre ici à une étude approfondie; nous nous bornerons à signaler quelques faits dont les recherches ultérieures pourront utilement tenir compte.

L'effet anticoagulant des injections intraveineuses de peptone s'explique par une réaction de l'organisme à laquelle la foie semble bien prendre une part prépondérante. Mais quelle est la substance active de la peptone? Dérive-t-elle de la digestion pepsique de la viande ou bien préexiste-t-elle dans celle-ci avant tout contact avec le ferment digestif? Cette seconde hypothèse peut *a priori* sembler assez plausible en raison de ce fait bien connu (Conradi, Uhlenhuth et Handel, Dold, etc...) que l'injection intravasculaire d'extrait de tissus n'ayant subi aucune influence altérante telle que celle de la pepsine, peut, tout comme l'injection de peptone, déterminer l'incoagulabilité du sang.

Pour juger de cette question, il n'est pas inutile de savoir que la peptone, ainsi que nous allons le démontrer, partage avec le suc de muscle la propriété, importante à considérer dans l'étude de la coagulation, de produire de la thrombine en présence de sérum.

A vrai dire, l'aptitude de la peptone à réagir avec le sérum

pour former la thrombine ne peut être mise en évidence qu'à une condition : la solution peptonée doit avoir été au préalable additionnée d'alcali jusqu'à réaction exactement neutre ou légèrement alcaline au papier de tournesol. La peptone du commerce est très souvent acide et cette acidité s'oppose à la formation de thrombine.

Exp. XXXVIII. — Nous employons couramment pour les usages bactériologiques une peptone de fort bonne qualité, préparée exclusivement au moyen de viande de bœuf (peptone de l'hôpital de Diest, Belgique). On dissout à froid 10 grammes de cette peptone dans 30 cent. cubes d'eau distillée. Une partie de la solution est gardée telle quelle, le reste est additionné de solution de KOH à 10 p. 100 jusqu'à réaction neutre ou très légèrement alcaline au tournesol (1).

On verse dans deux tubes A et B 0,5 cent. cube d'EPCa; dans trois tubes C, D, E, 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum (obtenu par coagulation de plasma oxalaté limpide de lapin additionné de 4 volumes d'EPCa). On laisse tomber dans A et C une goutte de solution de peptone non neutralisée, dans B et D une goutte de cette même solution neutralisée. Vingt minutes plus tard, on ajoute à tous les tubes 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Le mélange D se coagule en trois minutes; C et E, liquides après trois heures, sont trouvés coagulés le lendemain; A et B restent indéfiniment liquides.

On le voit, la peptone ne possède par elle-même aucun pouvoir coagulant; comme pour le suc de muscle, le concours du sérum est nécessaire à l'apparition de la thrombine (2). Que, d'autre part, même en présence de sérum, l'acidité de la peptone s'oppose à la production de thrombine, on peut le démontrer d'une manière indiscutable: nous savons que la thrombine apparaît en abondance dans le mélange de sérum et de suc de muscle; or, elle ne s'y produit pas si un tel mélange contient en outre de la solution non neutralisée de peptone. Par contre, cette solution, qui contrarie la formation de la thrombine, ne met pas obstacle au pouvoir coagulant de ce principe actif:

Exp. XXXIX. — Trois tubes A, B, C, contiennent 0,35 cent. cube d'EPCa et 0,15 cent. cube de sérum; on laisse tomber dans B une goutte de

(1) Il faut à peu près 0,1 cent. cube de cette solution pour 1 gramme de peptone sèche. La solution de peptone ne renferme qu'une dose modérée de Ca; elle précipite faiblement par l'oxalate.

(2) Les traces de KOH pouvant exister dans la solution de peptone alcalinisée, ne participent pas à la formation de thrombine en présence de sérum, ainsi qu'on le démontre en constituant des mélanges de sérum et de solutions très diluées (bleuisant légèrement le papier de tournesol) de KOH, et en ajoutant ensuite à ces mélanges du plasma dioxalaté.

la solution non neutralisée de peptone, puis dans les trois tubes une goutte d'extrait de muscle de bœuf. Une demi-heure plus tard, on ajoute à C une goutte de peptone, puis immédiatement après, aux trois tubes, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Les mélanges A et C se coagulent en quatre minutes. Dans B, une coagulation lâche et incomplète apparaît après deux heures seulement.

L'idée fort naturelle que l'aptitude de la peptone à réagir avec le sérum résulte simplement de ce qu'il s'est maintenu en elle du cytozyme propre à la viande qui a servi à sa préparation, trouve une confirmation dans le fait que, comme l'extrait de muscle de bœuf, la peptone se montre encore parfaitement active après chauffage à 100 degrés pendant un quart d'heure. Ajoutons qu'il n'est pas nécessaire, pour obtenir de la thrombine par addition de sérum, d'employer des solutions de peptone aussi concentrées que celle dont nous nous sommes servis dans les expériences précédentes : des solutions cinq ou dix fois plus étendues conviennent encore fort bien.

EXP. XL. — Trois tubes A, B, C, contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum. On ajoute à B une goutte de solution neutralisée de peptone (cinq fois plus diluée que celle des expériences précédentes), qui a été chauffée un quart d'heure à 100 degrés; à C, une goutte d'extrait de muscle de bœuf également chauffé à 100 degrés. Vingt minutes plus tard, on ajoute aux trois tubes 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation s'opère en six minutes dans B, en quatre minutes et demie dans C; A ne se coagule que le lendemain.

Nous avons vu, au cours de nos expériences sur les plaquettes, que le sérozyme abondant dans le sérum ne se rencontre pas dans le plasma que l'on vient de diluer et de recalcifier. Ce fait se constate encore de la manière la plus nette lorsqu'on emploie la peptone comme réactif du sérozyme :

EXP. XLI. — On a du sérum obtenu par dilution de 1 vol. de plasma oxalaté limpide avec 4 vol. d'EPCa. D'autre part, immédiatement avant l'expérience, on prépare une dilution identique (plasma dilué tout récent); trois tubes A, B, C renfermant 0,4 cent. cube d'EPCa, reçoivent 0,1 cent. cube de sérum; deux tubes D, E, contenant aussi 0,4 cent. cube d'EPCa, reçoivent 0,1 cent. cube de plasma dilué qu'on vient d'obtenir. Dans les tubes B, C, D, E, on laisse tomber une goutte de solution neutralisée de peptone, puis, après 3 minutes pour les tubes A et B, après 6 minutes pour le tube C, après 4 minutes pour le tube D, après 7 minutes pour le tube E, on ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Le mélange B se coagule au bout de 8 minutes, le mélange C au bout de 5. Le mélange A ne se coagule que le lendemain, les mélanges D et E restent indéfiniment liquides.

La production de thrombine dans le mélange sérum-peptone est assez rapide : elle se constate déjà après trois minutes de contact ; cependant elle ne semble atteindre son maximum qu'au bout d'un temps un peu plus long :

Exp. XLII. — Trois tubes renfermant 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum sont additionnés d'une goutte de solution de peptone. On ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté après 3 minutes pour le tube A, après 7 minutes pour le tube B, après 15 minutes pour le tube C. On constate que A se coagule en 8 1/2, B en 5 1/2, C en 4 minutes.

La peptone ne nous a point paru hâter d'une manière bien notable la coagulation de plasma oxalaté que l'on vient de diluer et de recalcifier. Il est nécessaire que le sérozyme prenne naissance tout d'abord dans le plasma avant que la production de thrombine aux dépens de ce sérozyme et de la peptone puisse s'effectuer. Il faut tenir compte, d'autre part, que la peptone employée est d'origine bovine et que le muscle de bœuf lui-même se montre nettement moins actif, au point de vue de l'accélération de la coagulation du plasma de lapin, que le muscle de lapin. Il serait intéressant, mais c'est une expérience que nous n'avons pas réalisée, d'étudier une peptone fabriquée au moyen de viande de lapin.

Mais, ainsi qu'il faut s'y attendre, la coagulation du plasma dilué recalcifié est considérablement accélérée quand on l'additionne à la fois d'un peu de sérozyme sous forme de sérum, et de peptone. Elle s'opère dans ces conditions beaucoup plus vite que si le plasma avait été additionné uniquement de sérum :

Exp. XLIII. — On peut opérer de deux façons : ou bien faire réagir tout d'abord le sérum sur la peptone et ajouter ensuite le plasma dilué recalcifié ; ou bien introduire successivement, dans ce plasma, le sérum et la peptone. L'expérience comprend des témoins où le plasma dilué ne reçoit aucune addition, ou est additionné exclusivement soit de sérum, soit de peptone.

Le plasma dilué recalcifié (1 vol. plasma oxalaté limpide, 4 vol. d'EPCa) est préparé immédiatement avant l'expérience. Cinq tubes contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa. Au tube A on ajoute 0,1 cent. cube de sérum et une goutte de solution neutralisée de peptone, puis 4 minutes 1/2 plus tard, 0,5 cent. cube du plasma que l'on vient de préparer. La coagulation survient dans ce mélange au bout de 9 minutes. Au tube B on ajoute d'abord 0,5 cent. cube de plasma récent, puis une goutte de peptone et 0,1 cent. cube de sérum. La coagulation demande 11 à 12 minutes. Les tubes C, D, E reçoivent 0,5 cent. cube du plasma récent, mais à C l'on

n'ajoute rien, tandis qu'à D on ajoute une goutte de peptone, et à E 0,1 cent. cube de sérum. La coagulation exige 74 minutes dans C, 71 minutes dans D (on voit que l'addition de peptone ne hâte guère la coagulation), 48 minutes dans E. Celui-ci, remarquons-le, ne se coagule pas très vite; il contient pourtant du sérum, mais ce sérum, nous le savons, est très pauvre en thrombine parce qu'il vient de plasma dépourvu de plaquettes; le sérozyme qu'il renferme reste quasi inutile, car le plasma récent, privé de ses plaquettes, ne contient que des traces de cytozyme.

Les expériences de ce genre sont plus démonstratives lorsqu'on les réalise avec du plasma qui, en même temps qu'on le dilue et le recalcifie, est mis au contact de SO^+Ba , et est ensuite centrifugé. Nous le savons, un tel plasma est incapable de se coaguler spontanément.

Exp. XLIV. — A 2 cent. cubes d'EPCa, on mélange quinze gouttes d'une suspension assez épaisse de SO^+Ba bien lavé, et 0,5 cent. cube de plasma oxalaté limpide. Après trois heures, on centrifuge et décante le liquide surnageant (plasma baryté).

Quatre tubes renferment 0,4 cent. cube d'EPCa. Au tube A on ajoute 0,1 cent. cube de sérum et une goutte de peptone, puis 9 minutes plus tard, 0,5 cent. cube de plasma baryté. La coagulation survient dans ce mélange au bout de 8 minutes. Au tube B, on ajoute d'abord 0,5 cent. cube de plasma baryté, puis une goutte de peptone et 0,1 cent. cube de sérum. La coagulation demande 46 minutes. Le tube C reçoit une goutte de peptone; ce mélange ne se coagule pas. Le tube D reçoit 0,1 cent. cube de sérum; la coagulation s'y effectue seulement au bout de plusieurs heures.

Cette expérience démontre que par elle-même, sans le secours du sérum, la peptone est impuissante, même en milieu calcifié, à faire coaguler le fibrinogène. Il en est de même, nous le savons, des plaquettes.

CONCLUSIONS.

La coagulation comporte une succession de phénomènes, qui aboutit à la formation de la thrombine, dont l'apparition au sein du plasma a pour conséquence immédiate la prise en caillot. Il paraît bien établi que l'agent direct de la coagulation, la thrombine, naît de la réaction mutuelle du sérozyme et du cytozyme. Celui-ci est fourni par les cellules, en particulier par les plaquettes. Mais d'où vient le sérozyme? L'expérience tend à faire admettre qu'au début du processus il n'existe pas comme tel dans le plasma, ou tout au moins ne peut y entrer en réaction. Grâce à quel mécanisme se produit-il ou bien peut-il agir à un moment donné? On l'ignore. C'est donc la phase initiale de la coagulation qui se montre encore la plus mystérieuse. Elle

se signale par l'apparition du sérozyme, et c'est à ce moment aussi que se manifeste l'influence si décisive et si obscure encore du contact avec les corps étrangers. Les cellules et notamment les plaquettes se bornent-elles à fournir le cytozyme ou bien interviennent-elles aussi d'une façon qu'on ne saurait préciser actuellement, dans la réaction dont le sérozyme résulte ? Quel est exactement le rôle du contact, à quel moment précis doit-il se manifester ? C'est sûrement au début du processus, car le contact n'est pas nécessaire à la réaction qui s'établit entre le cytozyme et le sérozyme. On ne pourra répondre à ces questions avant d'avoir soumis à des recherches plus approfondies les phénomènes intimes, et notamment la phase initiale, de la coagulation. Nous nous bornerons donc aujourd'hui à énumérer les constatations principales consignées dans ce mémoire :

1° La thrombine, surtout quand elle est âgée, est affaiblie par la précipitation des sels calcaïques propres au liquide qui la contient. Un procédé sensible pour la mettre en évidence dans un liquide consiste à ne pas décalcifier tout d'abord celui-ci, mais à l'additionner de volume égal de plasma oxalaté à 2 p. 1.000 :

2° En se coagulant, les plasmas débarrassés de plaquettes donnent un sérum pauvre en thrombine ; celle-ci est abondante au contraire dans les sérums issus de plasmas à plaquettes, dont, on le sait, la coagulation s'opère rapidement ;

3° La diffusion du principe actif des plaquettes (cytozyme) s'opère assez lentement dans le plasma ou la solution physiologique, plus rapidement dans les solutions concentrées de NaCl ; ce fait explique que le plasma salé, même bien centrifugé, fournit un sérum riche en thrombine lorsqu'on en provoque la coagulation par addition d'eau distillée ;

4° La cytozyme des plaquettes résiste au chauffage à 100 degrés ; on peut obtenir des extraits de plaquettes stérilisés à 100 degrés, et qui accélèrent considérablement la coagulation ;

5° Le rôle des plaquettes dans la coagulation est beaucoup plus important que celui des leucocytes. C'est pourquoi les exsudats péritonéaux très riches en leucocytes se coagulent plus vite lorsqu'on les additionne de plaquettes. Par l'action combinée de l'eau distillée et de CO_2 , on peut obtenir un plasma spontanément incoagulable, mais coagulable par addition de pla-

quettes. Il est fort vraisemblable que si les mammifères ne possédaient pas de plaquettes, leur sang se comporterait comme le sang des oiseaux, c'est-à-dire ne serait que lentement coagulable même en milieu calcifié, et fournirait aussi, par centrifugation rapide, un plasma à peu près incoagulable spontanément ;

6° En présence de sérum, les plaquettes (cytozyme) donnent de la thrombine. Cette réaction exige la présence de sels calciques solubles. On peut appeler *sérozyme* la substance active du sérum ;

7° Comme l'oxalate, le citrate empêche cette réaction, mais ne s'oppose pas à l'influence coagulante de la thrombine lorsque celle-ci a pu se produire. La forte concentration saline met obstacle aussi à la réaction ; celle-ci d'autre part peut s'effectuer dans un milieu de concentration saline faible ;

8° Il suffit d'une quantité relativement faible de sérozyme et de cytozyme pour que, la réaction s'établissant, le liquide acquière une énergie coagulante très manifeste ;

9° La réaction entre le cytozyme et le sérozyme est rapide, mais pas instantanée ;

10° La thrombine issue de la réaction entre les plaquettes et le sérum ne peut coaguler qu'une dose déterminée de plasma oxalaté ;

11° Le sérozyme se détruit par le chauffage à 55 degrés. Il est absorbé par le précipité de SO_4Ba , lequel enlève d'ailleurs au plasma le pouvoir d'engendrer du sérozyme. Il n'est pas absorbable par les globules sensibilisés ;

12° Le cytozyme des plaquettes intervient plus activement que celui des leucocytes dans la formation de la thrombine ;

13° Les extraits stériles de plaquettes (obtenus par chauffage à 100 degrés et centrifugation) conservent longtemps leur pouvoir de produire de la thrombine en présence de sérum ;

14° Le sérozyme, qu'on trouve en abondance dans le sérum, ne semble pas exister encore (au moins fonctionnellement) dans le plasma oxalaté que l'on vient de diluer et de recalcifier. L'un des phénomènes initiaux de la coagulation consiste donc, suivant toute vraisemblance, dans l'apparition au sein de liquide, de l'aptitude à réagir avec le cytozyme pour donner de la thrombine ;

15° Chauffé à 56 degrés, le plasma perd l'aptitude à produire du sérozyme ;

16° Du sérum qui s'est trouvé en contact avec des plaquettes a perdu, par ce fait même, le pouvoir de réagir avec de nouvelles plaquettes. Le sérozyme se consomme donc en réagissant avec le cytozyme. C'est pourquoi le sérum provenant de plasma contenant des plaquettes (ou de sang complet) est moins apte à réagir avec des plaquettes que ne l'est le sérum issu de plasma débarrassé de ces éléments ;

17° Le phénomène « d'excitoproduction » décrit par Bordet et Gengou (production rapide, par addition de sérum, de thrombine au sein du plasma salé dilué) s'explique parce que le sérozyme du sérum réagit avec le cytozyme du plasma pour engendrer de la thrombine ;

18° Le cytozyme du suc de muscles résiste comme celui des plaquettes au chauffage à 100 degrés ;

19° Les expériences où l'on provoque la coagulation du plasma oxalaté par une thrombine née du mélange de plaquettes ou suc de tissus avec du sérum, conviennent particulièrement à l'étude de la spécificité des principes actifs de la coagulation ;

20° La peptone contient du cytozyme provenant de la viande qui a servi à sa fabrication. Même si elle a été chauffée au préalable à 100 degrés, la solution de peptone donne de la thrombine lorsqu'on y ajoute du sérum. Cette réaction exige que l'acidité de la peptone ait été neutralisée. L'acidité en effet s'oppose à la formation de thrombine, mais non à l'influence coagulante de celle-ci ;

21° Par elle-même, sans le secours du sérum, la peptone, pas plus que les plaquettes ou le suc de muscle, ne convertit le fibrinogène en fibrine, même si le liquide ambiant contient des sels calciques, à condition bien entendu que celui-ci soit exempt de sérozyme ou des matières capables d'engendrer ce principe. Tel est le cas du plasma baryté, dont l'emploi est utile dans beaucoup d'expériences sur la coagulation ;

22° Le sérozyme qui, dans le sérum, agit sur la peptone n'existe pas encore dans le plasma oxalaté que l'on vient de diluer et de recalcifier.

SUR L'EXTRAORDINAIRE SENSIBILITÉ

DE L'ASPERGILLUS NIGER

VIS-A-VIS DU MANGANÈSE

par M. GABRIEL BERTRAND

Les recherches que j'ai publiées antérieurement sur la laccase et sur l'emploi du manganèse comme engrais ont déjà laissé entrevoir l'extrême petitesse de la proportion de manganèse qui suffit à impressionner les végétaux. Les expériences que je vais décrire préciseront cette notion et lui donneront, en même temps, une valeur inattendue, je pourrais même dire surprenante. Grâce, en effet, à une technique sévère et à des précautions minutieuses, je suis parvenu à obtenir, d'une manière constante, en opérant avec l'*Aspergillus niger*, des augmentations de récolte facilement appréciables par l'addition au milieu de culture d'une quantité aussi extraordinairement petite qu'un milliardième et même un décimilliardième de manganèse, soit une proportion d'un milligramme seulement de métal dans 10.000 litres de liquide nutritif.

Une des grandes difficultés à résoudre pour atteindre ce résultat a été la purification des substances organiques ou minérales destinées à l'alimentation de l'*Aspergillus*. Déjà, dans les expériences que j'ai faites avec Javillier, en vue de savoir ce que deviennent les récoltes du champignon sous l'influence combinée du manganèse et du zinc (1), nous avons éprouvé quelque peine à préparer un milieu de culture dans lequel il n'y eût guère plus de 1/500 de milligramme de manganèse par litre. Or, c'est là une proportion d'impureté relativement énorme par rapport à celle qu'il me fallait éliminer des substances destinées à la préparation du milieu nutritif.

J'ai d'abord essayé la méthode des cristallisations successives. Même en consentant à de grosses pertes, cette méthode

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 241 et p. 515, 1912.

ne m'a pas toujours conduit au but. J'arrivais bien, après un nombre plus ou moins grand de cristallisations, à obtenir des substances dont une dose relativement élevée ne donnait plus la réaction cependant très sensible du manganèse par le procédé que j'ai décrit (1), mais lorsque j'analysais les cendres de l'*Aspergillus* développé sur un milieu préparé avec ces substances, je pouvais encore trouver des traces du métal que la plante avait en quelque sorte concentrées dans ses tissus. La méthode des cristallisations successives n'a bien réussi que pour le sulfate ferrico-ammonique : le sulfate de manganèse, qui se trouve dans la solution du sel au moment de la préparation, ne pouvant remplacer ni le fer trivalent, ni l'ammonium monovalent, reste dans les eaux mères dès la première cristallisation. Je n'ai employé le sel double, toutefois, qu'après trois cristallisations.

Pour la plupart des autres substances, j'ai éliminé le manganèse à l'état de bioxyde en ajoutant à la solution, rendue légèrement alcaline par l'ammoniaque, un peu d'eau oxygénée pure. Étant donnée la pureté déjà très grande des substances sur lesquelles j'opérais, le bioxyde ne s'est pas produit d'une manière visible. J'en ai assuré la complète séparation en l'entraînant par collage à la surface d'un précipité de phosphate ammoniaco-magnésien obtenu par addition au liquide d'une molécule de phosphate diammonique et d'une molécule de sulfate de magnésium (2). Après quelques heures de repos le liquide a été filtré et concentré dans une capsule de platine.

Cette méthode chimique a été appliquée aussi bien au saccharose qu'au nitrate, au phosphate et au sulfate d'ammonium, au carbonate de potassium, au sulfate de zinc et à celui de magnésium. Dans la solution de ce dernier, après avoir ajouté quelques gouttes d'ammoniaque et l'eau oxygénée, je n'ai introduit, pour la précipitation, comme cela se comprend,

(1) *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. IX, p. 361, 1911.

(2) Par exemple, 0 gr. 66 de phosphate et 1 gr. 23 de sulfate pour un demi-litre environ de solution à 15-20 p. 100 de la substance à purifier. Le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien, dissous et oxydé par le persulfate de potassium en présence de nitrate d'argent, permet de doser le manganèse qui se trouvait dans la substance. C'est ainsi que j'ai trouvé les poids de manganèse suivants dans un kilogramme de diverses substances parmi les plus pures du commerce : 0 milligr. 45 pour le phosphate d'ammonium, 2 milligr. pour le sulfate de zinc, 25 milligr. pour le chlorure de sodium, etc.

que du phosphate d'ammonium. Pour obtenir la cristallisation du saccharose, j'ai poussé la concentration jusqu'à ce que le sirop contienne un peu plus des deux tiers de son poids de sucre; je l'ai mélangé alors avec son volume d'alcool à 95 degrés redistillé et je l'ai abandonné, après amorçage, dans un matras bouché. Celui-ci a été brisé lorsque les cristaux n'augmentaient plus. Quant aux sels, après les avoir essorés, ils ont été lavés et recristallisés en se servant d'eau pure, redistillée dans le vide avec un appareil en verre.

A côté du saccharose, j'ai utilisé l'acide succinique comme substance alimentaire carbonée. La purification de cet acide a été obtenue par une série de cristallisations, d'abord dans l'acide sulfurique à 5 p. 100, puis dans l'eau seule (1).

Il est à peine utile de dire qu'il m'a fallu prendre les précautions les plus minutieuses au cours des expériences pour éviter toutes contaminations par le manganèse, me mettre par conséquent à l'abri des poussières, ne pas chauffer les solutions de substances pures dans des vases de verre, mais de quartz ou de platine, etc.

Les cultures ont été faites dans des matras cylindro-coniques à large col, de 750 cent. cubes de capacité, en quartz fondu (2). Chaque matras renfermait en général :

Eau pure, redistillée dans le vide.	200 grammes.
Carbonate de potassium	0 gr. 08
Nitrate d'ammonium	0 gr. 60
Phosphate d'ammonium	0 gr. 08
Sulfate d'ammonium	0 gr. 04
Sulfate de magnésium	0 gr. 17
Alun de fer	0 gr. 0172 (soit : 0.002 de Fe).
Sulfate de zinc	0 gr. 0088 (soit : 0.002 de Zn).
Silicate de potassium	0 gr. 008
et acide succinique	8 grammes.
ou saccharose	9 grammes.
et acide succinique (pour acidifier) .	0 gr. 10

(1) En évaporant à sec, dans une capsule de platine, les eaux-mères débarrassées par cristallisation et décantation de la majorité de l'acide succinique qu'elles renfermaient, j'ai obtenu un résidu dans lequel il y avait 0 milligr. 11 de manganèse pour un kilogramme d'acide succinique « purissime » du commerce.

(2) On peut déjà constater l'action d'un cent-millionième et même d'un milliardième de manganèse en faisant les cultures dans certains matras en verre peu attaquables ou mieux dans des vases en porcelaine. On utilise dans mon laboratoire des cuvettes cylindriques en porcelaine recouvertes d'une sorte de cristallisoir renversé en verre mince que retiennent, pour éviter l'obturation complète, des crochets en aluminium.

Le sulfate de manganèse, préparé à partir du permanganate de potassium, comme je l'ai déjà indiqué (1), était introduit, sauf, bien entendu, dans les matras témoins, sous forme de solutions titrées dont on défalquait le poids des 200 grammes d'eau pure.

Après avoir été bouchés avec des tampons d'ouate hydrophile et recouverts de capuchons en papier, les matras étaient stérilisés à 115 degrés durant vingt minutes.

Les spores ou conidies employées pour lesensemencements provenaient tantôt d'une race banale, développée sur le liquide ordinaire de Raulin (expériences 4 à 9), tantôt d'une race particulière au laboratoire, très sensible au zinc (expériences 1 à 3). Dans ce dernier cas, on mettait 100 fois moins de sulfate de zinc dans le liquide nutritif qu'il est indiqué ci-dessus.

Deux procédés ont été mis en usage pour lesensemencements. Dans le premier (expériences 1 à 5), on transportait directement les conidies à la surface du liquide nutritif à l'aide d'un fil de platine, en multipliant un même nombre de fois les transports, de manière à compenser autant que possible les différences qui existaient entre chacun d'eux. Dans le second procédé (expériences 6 à 9), on préparait d'abord une dilution de conidies dans l'eau stérilisée, puis, en agitant bien chaque fois, on prélevait un cent. cube de cette dilution par matras.

Les cultures ont été faites, non dans une étuve, où la température varie trop d'un endroit à un autre, mais dans une chambre thermostat, à la température uniforme de + 35 degrés. Les récoltes ont eu lieu, suivant les expériences, après neuf à douze jours.

Voici, rassemblés en un tableau, les résultats de toutes les expériences que j'ai entreprises avec les doses de 1/100.000.000, de 1/1.000.000.000 et de 1/10.000.000.000 de manganèse. Dans ce tableau, les expériences 1 à 7 ont été réalisées avec l'acide succinique et les expériences 8 et 9 avec le saccharose acidulé par l'acide succinique comme substances alimentaires carbonées.

(1) En collaboration avec Javillier. *Bull. Soc. chim.*, 4^e série, t. XI, p. 212, 1912.

N ^o des exp.	DURÉE en jours.	POIDS SEC, EN GRAMMES, DES RÉCOLTES OBTENUES :			
		Sans addition de Mn.	APRÈS ADDITION DE		
			Un cent-millième de Mn.	Un milliardième de Mn.	Un déci-milliardième. de Mn.
1	9	1,55	2,05	"	"
	"	1,79	"	"	"
2	9	0,865	1,715	1,260	"
3	10	0,68	1,69	1,30	1,44
	"	0,68	"	"	"
4	10	0,61	1,49	"	"
		(moy. de 3 cult.)			
5	10	1,16	"	1,24	1,27
6	10	1,14	"	1,73	"
	"	1,23	"	"	"
7	12	0,64	1,89	"	0,655
		(moy. de 3 cult.)			
8	10	0,55	"	0,80	"
9	9	0,557	2,35	1,18	0,603
		(moy. de 3 cult.)	2,20	"	(moy. de 3 cult.)

Je n'ai pas dosé seulement le poids de matière sèche de chaque récolte, j'ai préparé aussi les cendres dans lesquelles j'ai recherché et dosé le manganèse, quand il y avait lieu. Les conditions de la recherche me permettant d'atteindre jusqu'au millième et probablement jusqu'au demi-millième de milligramme du métal cherché, je n'ai trouvé trace de manganèse ni dans les récoltes témoins (expériences 1 à 7) prises séparément ou reprises après en avoir réuni quinze ensemble, ni dans aucune des récoltes obtenues sur les milieux au milliardième et au déci-milliardième. Par contre, j'ai retrouvé de 1 à 1,5 millième de milligramme de manganèse dans les récoltes développées sur les milieux au cent-millionième, qui en renfermaient la quantité absolue de 2 millièmes de milligramme.

Ainsi, malgré toutes les modifications introduites dans la

composition du milieu nutritif, la race du végétal, la durée de la culture, modifications qui ont nécessairement fait varier le poids des récoltes d'une expérience à l'autre, la même conclusion générale ressort avec évidence de chacune de celles-ci, prise en particulier, à savoir qu'une *proportion extraordinairement petite de manganèse suffit au développement de l'Aspergillus niger*.

Les résultats de ces recherches, bien conformes à l'interprétation catalytique du rôle joué par le manganèse dans les cellules vivantes, sont très suggestifs.

On possédait jusqu'ici des exemples remarquables de sensibilité de l'organisme aux poisons. En ce qui concerne particulièrement *l'Aspergillus niger*, Raulin avait montré qu'il suffit d'ajouter la proportion minima d'un 1/1.600.000 de nitrate d'argent au milieu de culture pour nuire sensiblement aux progrès du végétal (1). En opposant à ce résultat l'influence favorable exercée sur le même *Aspergillus* par le 1/10.000.000.000 de manganèse, on voit que l'organisme peut être plus sensible encore aux substances biogénétiques.

Il va donc falloir considérer avec plus d'attention que jamais l'intervention possible des traces de métalloïdes et de métaux présents dans le corps des animaux et des plantes et, par généralisation, des substances complexes dont la proportion n'est guère plus élevée. Il faudra envisager aussi comme pouvant avoir de l'importance dans certains phénomènes physiologiques ou pathogéniques, dans le degré de fertilité des sols, etc., des modifications chimiques du milieu en apparence très minimes.

Enfin, il sera nécessaire, dans beaucoup de recherches, de se mettre très soigneusement en garde contre l'influence des impuretés. J'ai rencontré dans les préparations les plus pures de sulfate ferreux du commerce de 0,2 à 0,5 p. 1.000 de manganèse. D'après les expériences rapportées aujourd'hui, quelques dixièmes et même quelques centièmes de milligramme de ce sel peuvent donc suffire pour apporter dans un milieu de culture une dose de manganèse facilement appréciable par *l'Aspergillus niger* et pour faire attribuer, par erreur, au sulfate

(1) Études chimiques sur la végétation. *Thèse doct. ès sciences*, p. 133, Paris, 1870.

ferreux des effets dus exclusivement à une impureté qui l'accompagne.

On peut supposer que, dans mes propres expériences, l'ensemble des substances nutritives des milieux témoins renfermait encore des traces infinitésimales de manganèse. Est-il possible d'atteindre un degré de pureté plus parfait et qu'arriverait-il alors avec l'*Aspergillus*? C'est ce que je me propose maintenant de rechercher.

SUR LE RÔLE CAPITAL DU MANGANÈSE

DANS LA PRODUCTION DES CONIDIES DE L'ASPERGILLUS NIGER

Au cours de ses belles recherches sur le développement de l'*Aspergillus niger*, Raulin a mis en évidence le rôle favorable exercé par une petite quantité de fer sur l'accroissement global de la plante : la dose de 10 milligrammes de ce métal, à l'état de sulfate, dans un litre de liquide approprié, lui a fourni les meilleures récoltes. Raulin n'a pas étudié le mode d'action du fer; il semble néanmoins lui attribuer un rôle spécial dans la formation des spores ou, plus exactement, des conidies. « En l'absence des sels de fer, fait-il, en effet, remarquer, les spores se forment de plus en plus péniblement à mesure que le liquide d'où elles naissent a déjà produit un plus grand nombre de récoltes » (1).

Cette remarque a récemment attiré l'attention de Sauton et l'a conduit à diverses expériences à la suite desquelles il a cru pouvoir lier définitivement la production des conidies à la présence du fer (2).

Une telle conclusion dépassait la portée des résultats obtenus. Reprenant les expériences, en collaboration avec Sauton, Javillier a reconnu que le phénomène de la formation des conidies était plus complexe et dépendait à la fois, mais d'une manière

(1) Thèse de doctorat ès sciences physiques, p. 186, Paris, 1870.

(2) Comptes rendus de l'Acad. des Sciences, t. CLI, p. 241, 1911, et Annales de l'Institut Pasteur, t. XXV, p. 922, 1911.

différente, de la présence du fer et de celle du zinc. Lorsque, en effet, on ajoutait les deux métaux à la dose habituelle de 4/100.000, les conidies apparaissaient normalement et, si on n'ajoutait que du zinc, la plante restait stérile; mais, si on mettait ni fer, ni zinc, les conidies se produisaient au moins aussi vite qu'en présence de fer seul. D'où cette nouvelle mais évidente conclusion que le fer n'est pas, comme il paraissait tout d'abord, l'élément indispensable à la sporulation (1).

Ces curieux résultats trouvent leur explication dans certaines expériences que je poursuis actuellement à propos du rôle biologique du manganèse et que je vais résumer.

Je rappellerai, tout d'abord, combien il est difficile d'obtenir les sels minéraux et les produits organiques indispensables à la culture de l'*Aspergillus niger* dans un état de pureté suffisant lorsqu'il s'agit d'expériences précises sur l'intervention biologique du manganèse. J'ai donné une mesure de cette difficulté dans les recherches que j'ai faites avec Javillier sur l'influence combinée du manganèse et du zinc sur la végétation (2); une meilleure encore dans celles que je viens de publier sur l'extraordinaire sensibilité de l'*Aspergillus niger* vis-à-vis du manganèse (3).

Dans les premières de ces recherches, nous avons, Javillier et moi, employé des doses relativement grandes de manganèse, élément dont nous voulions connaître alors la proportion optimale, et les milieux nutritifs les purs qui servaient de témoins renfermaient encore, malgré toutes les précautions, à peu près 1/500 de milligramme de manganèse par litre. Dans ces conditions, nous avons observé que « le manganèse possède une action qui, sans être très marquée, est cependant sensible sur la formation des conidies, autant qu'on en pouvait juger par la coloration des cultures. Les *Aspergillus* cultivés sur des doses moyennes de ce métal (1/25.000 à 1/1.000) étaient, à l'arrêt des cultures, sensiblement plus noires que les *Aspergillus* témoins, d'une part, et les *Aspergillus* plus riches en manganèse, d'autre part ».

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLIII, p. 1177, 1911.

(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 241 et p. 315, 1912.

(3) *Ibid.*, p. 767.

J'ai réussi depuis, comme on l'a vu (1), à purifier d'une façon beaucoup plus parfaite toutes les substances nutritives et à opérer dans des conditions où l'influence du manganèse peut être étudiée avec une très grande précision. J'ai reconnu alors qu'en présence des doses habituelles (1/100.000) de zinc et de fer, mais en l'absence de manganèse, il n'y a pas de formation de conidies par l'*Aspergillus niger* : les colonies restent indépendantes les unes des autres, contractées et de couleur blanche.

Si, en outre du zinc et du fer, on ajoute une trace de manganèse, on obtient, au contraire, un beau mycélium, dont la surface, noire et veloutée, est un véritable tapis de conidio-phores.

J'ai varié mes expériences en introduisant dans le liquide nutritif soit du saccharose, soit de l'acide succinique, comme source de carbone; en prenant les conidies soit de la race banale, spontanée, soit d'une race particulière au laboratoire, très sensible au zinc, pour lesensemencements; enfin, en essayant des doses diverses de zinc et de manganèse. Les résultats ainsi obtenus me permettent de formuler les conclusions générales suivantes :

Le fer, le manganèse, le zinc et, sans doute, tous les éléments nutritifs, agissent synergiquement sur la croissance et sur la formation des conidies de l'*Aspergillus niger*.

Lorsqu'un de ces éléments vient à manquer ou, tout au moins, à se raréfier beaucoup, la plante se développe à peine, elle ne produit, en conséquence, presque pas de matière organique.

Quel que soit l'état de développement, si la proportion de manganèse passée dans la matière organique est trop minime, la plante reste stérile; elle se recouvre, au contraire, de conidies, si la quantité de manganèse absorbée par le mycélium atteint une proportion suffisante.

Ainsi, il y a un rapport entre le manganèse, d'une part, le fer et le zinc, d'une autre, qui suffit à la croissance de l'*Aspergillus*, mais qui ne permet pas le développement des organes de reproduction.

(1) Dernière citation.

Ces conclusions générales permettent de comprendre ce qui se passe dans les cas différents de la culture de l'*Aspergillus niger*, y compris ceux des expériences antérieurement publiées. Lorsqu'on n'opère pas avec des substances suffisamment pures, et j'ai rappelé combien cette condition est difficile à remplir, les très minimes quantités de manganèse introduites dans les milieux nutritifs peuvent suffire, en présence du fer et du zinc, pour obtenir des mycéliums abondants, mais sans conidies. Une nouvelle quantité de manganèse ajoutée alors, soit intentionnellement, soit comme impureté du sulfate ferreux, lequel en renferme toujours (1), détermine la sporulation. Lorsque, au contraire, dans le milieu nutritif, on n'ajoute ni fer, ni zinc, ou seulement du fer ou du zinc, les mycéliums qui prennent naissance sont si réduits que le rapport de manganèse introduit, volontairement ou non, au poids de matière organique formée peut être suffisant à la production des conidies.

Ces recherches, établissant des relations entre le fer, le manganèse et le zinc dans l'équilibre des fonctions physiologiques de l'*Aspergillus niger*, sont remarquables à plus d'un point de vue. Non seulement elles nous fournissent un exemple très net de l'existence d'éléments dominateurs de certaines fonctions biologiques, mais elles nous portent à considérer cette notion, importante et rarement envisagée, sous un aspect nouveau. Sans doute l'iode, dans l'action complexe de la glande thyroïde, le fer et le cuivre, dans le rôle convoyeur d'oxygène du sang chez divers animaux, possèdent le caractère d'éléments dominateurs puisqu'ils font partie intégrante soit de la thyroïdine, soit de l'hémoglobine ou de l'hémocyanine, mais la vie devient rapidement impossible chez les animaux privés de leur glande thyroïde ou de leur sang, tandis que l'*Aspergillus niger* peut se développer admirablement sans formation de conidies. Dans le cas des animaux considérés, l'iode, le fer ou le cuivre dominant plus qu'une fonction physiologique, ils dominent la vie tout

(1) J'ai dosé dans les échantillons de sulfate ferreux les plus purs que j'ai pu me procurer en France et en Allemagne de 0,2 à 0,5 milligrammes de manganèse par gramme de sel. Pour ce dosage, j'ai opéré directement sur le sulfate ferreux, suivant la méthode que j'ai décrite antérieurement (*Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. IX, p. 361, 1911), mais en ajoutant un peu plus de persulfate de potassium et, afin d'atténuer la coloration jaune du composé ferrique, un gramme de phosphate acide de potassium.

entière; dans celui de l'*Aspergillus*, le manganèse, indispensable aussi au développement général de l'individu, conditionne, en outre, une fonction de résistance temporaire et de propagation nécessaire seulement à l'espèce.

Les mêmes recherches, jointes d'ailleurs à celles que j'ai déjà citées dans ce mémoire, font ressortir d'une manière frappante la synergie des éléments constitutifs de la matière vivante. A des proportions diverses, grandes ou petites, tous ces éléments sont nécessaires, tous concourent à la formation, au moins globale, des liquides et des tissus dont l'individu se compose. L'insuffisance d'un seul de ces éléments peut entraîner la diminution de tous les autres et provoquer, par suite, un arrêt général de la croissance. Ainsi consolidé par l'expérience directe, le principe de la synergie des éléments dans l'édification de l'organisme prend une grande importance au point de vue du choix de certaines médications, de l'établissement des régimes, du choix et du dosage des engrais.

Enfin, la modification profonde apportée dans le cycle évolutif de l'*Aspergillus niger* par un minime changement dans la quantité de manganèse mise à la disposition de cette plante, apporte un argument bien digne d'être pris en considération dans la recherche des causes de la subordination des processus fonctionnels chez les êtres vivants.

LA LÈPRE DES RATS

(SECOND MÉMOIRE)

RECHERCHES ÉTIOLOGIQUES ET RÉFLEXIONS QU'ELLES SUGGÈRENT A PROPOS DE LA LÈPRE HUMAINE

par E. MARCHOUX et F. SOREL.

ÉTIOLOGIE.

La maladie du rat est certes une maladie très intéressante en elle-même. Mais si nous en avons entrepris l'étude, ce n'est pas dans le but unique d'en pénétrer les mystères. Nous avons été surtout attirés par la ressemblance de cette affection avec la lèpre humaine et, devant l'impossibilité d'expérimenter sur les animaux avec le bacille humain, par l'espérance d'appliquer à la lèpre de l'homme quelques-unes des conclusions de notre travail sur la lèpre des rats. L'étiologie, les voies de pénétration des germes, en un mot l'épidémiologie d'où découle la prophylaxie, voilà les questions qui nous ont surtout préoccupés.

Dès que nous eûmes constaté l'existence de la maladie de Stefansky parmi les rats vivant dans l'agglomération parisienne, nous avons cherché à nous en procurer un certain nombre pour observer chez les animaux capturés la marche de l'affection. Comme nos devanciers, nous avons vérifié que la lèpre étendue à l'épiderme et aux muscles était rare, alors que nous la rencontrions beaucoup plus fréquemment limitée aux ganglions sous-cutanés et à leur voisinage.

Par inoculation péritonéale, le bacille se multiplie dans les viscères. — On pouvait se demander si la localisation presque exclusive de l'infection à la région superficielle ne tenait pas à des exigences biologiques du parasite qui se développerait difficilement à la température plus élevée des organes profonds, le foie et la rate, si rarement lésés. Pour nous en assurer,

nous avons inoculé dans le péritoine un certain nombre de rats blancs.

Exp. VI. — 27 juillet 1911. Un rat d'égouts sacrifié présente des lésions assez marquées autour du paquet ganglionnaire inguinal. Des lambeaux de tissu conjonctif sont broyés en eau distillée stérile. Le liquide louche qui surnage après dépôt des particules volumineuses, est riche en bacilles A. R. Quelques gouttes en sont injectées dans le péritoine de 5 rats blancs.

20 octobre 1911. — Une mère pleine est morte dans le bocal. Elle porte au niveau de la rate un nodule de la grosseur d'un petit pois qui est contenu dans l'épiploon et adhère à la paroi pariétale du péritoine. Ce nodule est rempli d'A. R. Tout l'épiploon en contient. On en trouve aussi sur la paroi de l'utérus gravide, mais point dans le placenta, ni dans les fœtus. Le foie, un peu gras, contient d'assez nombreux bacilles. La rate en renferme aussi beaucoup. Dans les frottis faits avec de la pulpe provenant des sommets du poumon, se voient quelques A. R., mais on en trouve surtout en grande quantité dans les préparations de ganglions médiastinaux.

2 novembre. — Un deuxième rat meurt. Les ganglions mésentériques renferment une énorme quantité de bacilles. La rate en est farcie, de même que l'épiploon. Pas de bacilles dans les frottis du foie. Les poumons ont été mangés par les autres rats du même bocal et n'ont pu être examinés. Des bacilles assez nombreux sont trouvés dans les frottis des ganglions inguinaux et axillaires.

3 novembre. — Un troisième rat est sacrifié. Il est beaucoup moins infecté que le précédent. Dans les ganglions mésentériques, l'épiploon et la rate, il y a quelques bacilles. On n'en voit pas dans les frottis de foie. Les ganglions bronchiques sont pleins d'A. R. Quelques-uns aussi se rencontrent dans le poumon. Il y en a dans un ganglion inguinal.

5 décembre. — Le rat qui est mort aujourd'hui porte appendue à l'épiploon une petite tumeur de la taille d'une noisette qui est bourrée d'A. R. Beaucoup dans l'épiploon, la rate, les ganglions mésentériques; moins dans le foie. Un petit nombre se rencontrent dans les poumons et beaucoup plus dans les ganglions bronchiques.

20 décembre. — Le dernier rat meurt. A. R. nombreux dans les ganglions inguinaux, dans les ganglions mésentériques, l'épiploon, la rate, le foie, dans les ganglions médiastinaux. Quelques-uns dans les poumons. Des fragments de foie et de rate sont fixés et coupés. Dans le foie, les bacilles sont contenus dans les cellules de Kupfer et aussi dans les cellules du tissu conjonctif des espaces porte. La disposition des bacilles dans la rate est la même que dans les ganglions, les foyers sont aussi compacts.

L'inoculation intra-péritonéale est tout aussi sûre que l'inoculation sous la peau et le bacille se développe avec autant de facilité dans l'épiploon, le foie et la rate, que dans le tissu conjonctif sous-cutané. Il faut donc admettre que l'infection spontanée ne se fait pas dans la profondeur.

L'inoculation spontanée est superficielle. — L'époque tardive à laquelle apparaissent les lésions des organes abdominaux,

la précocité, au contraire, de l'envahissement des ganglions superficiels, indiquent nettement que la porte d'entrée est ouverte dans le revêtement cutané ou à son voisinage.

Par nos expériences d'inoculation, nous avons vu que les bacilles A. R. se rendent très exactement aux ganglions qui servent de confluent aux lymphatiques de la région inoculée. Une infection du train postérieur, faite à la partie moyenne du dos ou sur la ligne blanche, provoque l'infection des ganglions inguinaux droits et gauches. Si l'inoculation est unilatérale, la lésion ganglionnaire est unilatérale également.

Faite au-dessus de l'ombilic, la blessure infectante contamine les ganglions de l'aisselle, du côté où elle est pratiquée.

De la tête ou du cou, l'infection gagne les ganglions sous-maxillaires et cervicaux. Cette localisation des germes est si précise qu'elle peut servir à explorer le système lymphatique du rat.

Toutes ces observations sont d'accord pour dénoncer l'inoculation cutanée et même signaler la région où elle s'est faite.

Il fallait alors chercher comment elle se produisait.

Elle ne se fait pas par la cicatrice ombilicale ou le mamelon.

— Un certain nombre de rats capturés très jeunes et conservés au laboratoire, isolés dans des cages, étaient porteurs de bacilles quand on les sacrifiait à l'état adulte. Cette constatation avait, tout d'abord, attiré notre attention sur une infection possible de la cicatrice ombilicale.

En ce cas, ce serait toujours le groupe ganglionnaire axillaire qui serait atteint et non pas le paquet de l'aîne. La localisation inguinale, si fréquente, nous a fait rejeter cette hypothèse.

L'infection par le mamelon doit être écartée pour des raisons du même ordre. Si elle se faisait toujours par cette voie, elle serait aussi commune dans l'aisselle que dans l'aîne. D'autre part, il est impossible de trouver des mamelons chez les mâles qui sont, cependant, plus fréquemment infectés que les femelles. Parmi les rats reconnus spontanément malades, nous avons trouvé 64 p. 100 de mâles, et seulement 36 p. 100 de femelles.

La localisation des germes ne renseigne pas sur le point de départ de l'infection. — Pensant que la première multiplication microbienne et aussi la plus importante devait se faire toujours *in situ* au point d'inoculation, nous avons entretenu l'espoir de découvrir la porte d'entrée par l'examen direct.

Sur un certain nombre de rats spontanément infectés, nous avons pratiqué, avec le bistouri, des raclages successifs de la partie profonde du derme, en nous éloignant progressivement du ganglion infecté. Avec la pulpe ainsi obtenue, nous pratiquions des frottis et nous y recherchions les bacilles acido-résistants. Cette méthode, qui nous permettait de trouver des germes dans des régions assez éloignées de notre point de départ, ne nous donnait que des indications trop vagues pour pouvoir en tirer une conclusion.

Nous avons pris le parti de sacrifier le temps nécessaire à faire l'examen d'un rat malade par fixation et coupe de la peau.

A cet effet, nous avons prélevé et fixé une notable étendue de peau dans toute la région que les frottis nous avaient indiquée comme contaminée. Cette pièce recouvrait plus de la moitié de l'abdomen; elle s'étendait à droite jusqu'à l'aîne et comprenait la peau du fourreau, des bourses et de la base de la queue. Cette peau a été partagée en segments et coupée en série. Les rubans, disposés parallèlement dans des portefeuilles en carton, formaient des bandes de 25 centimètres environ.

Dix coupes de chaque bande ont été colorées et examinées. Nous supposons qu'une zone d'infection plus intense nous permettrait de découvrir le point d'inoculation primitif. Notre espoir a été déçu, ainsi qu'en témoigne le schéma ci-après. Nous avons trouvé des foyers échelonnés et nombreux indiquant ou bien de multiples portes d'entrée, ou encore des lieux d'élection du bacille qui s'y est multiplié plus qu'ailleurs. En somme, le rat était plus infecté qu'il ne paraissait au premier abord, et la maladie, loin d'être à son début, avait déjà envahi une notable étendue de la peau.

Devant la difficulté de ces recherches histologiques et leur incertitude, nous avons renoncé à les continuer. Nos expériences d'inoculation nous ont, d'ailleurs, averti de l'erreur qui les avait motivées. Comme nous avons pu nous en rendre compte, le point d'inoculation, non seulement n'est pas toujours le lieu

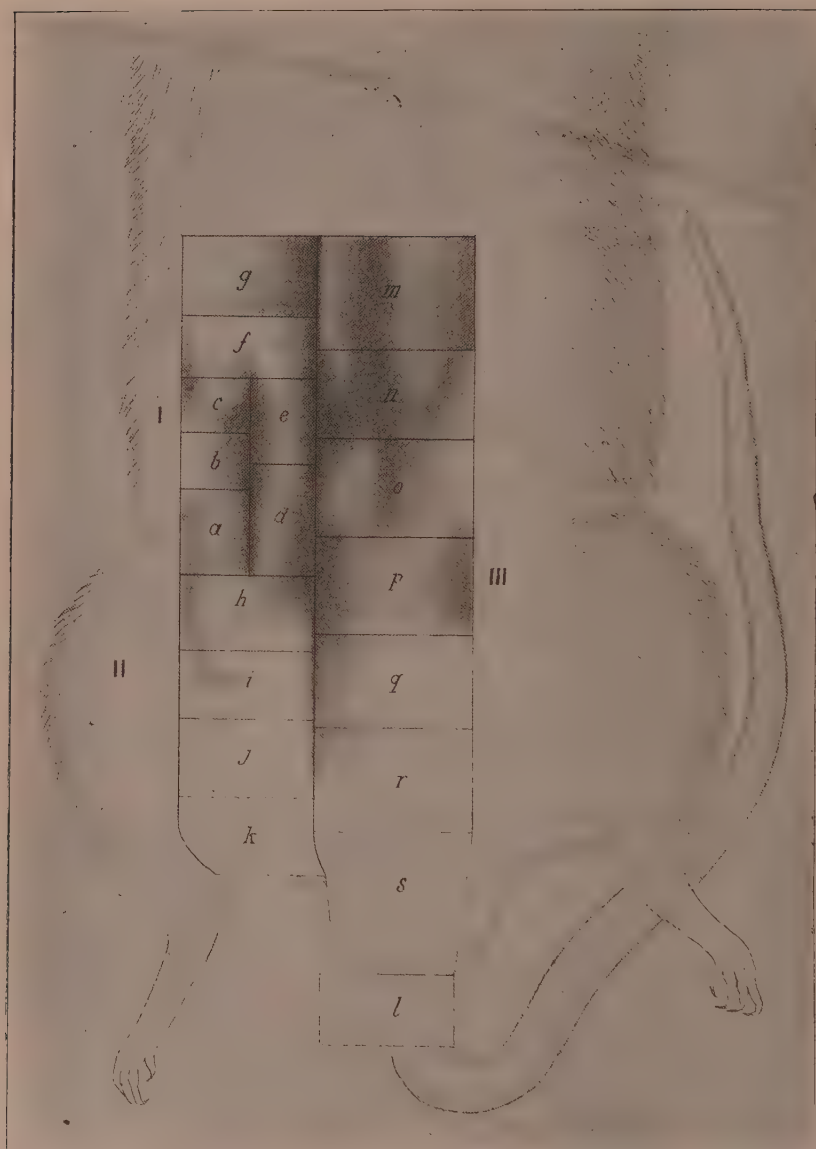


FIG. 2. — La zone marquée de lettres indique l'étendue de la peau qui a été fixée et coupée; les parties ombrées, le siège et le nombre relatif de bacilles.

où les bacilles se sont multipliés le plus abondamment, mais il arrive parfois qu'il est le siège d'une infection insignifiante ou même nulle, alors que les ganglions de la région sont remplis de bacilles. On en verra des exemples dans les expériences que nous avons rapportées plus haut.

Il n'y a pas de contagion génitale. — Une contagion génitale nous avait paru tout d'abord vraisemblable, car nous avons trouvé assez communément infecté le tissu conjonctif sous-cutané de la vulve. Il est vrai qu'au contraire, nous n'avons jamais vu de bacilles acido-résistants, ni dans la peau du fourreau chez le mâle, ni sous la muqueuse du pénis.

Pour élucider cette question, nous avons organisé deux séries d'expériences. Dans l'une, quatre femelles ont été infectées à la vulve et laissées dans une cage d'élevage en contact avec un même nombre de mâles. Les animaux sont restés un an en observation.

Plusieurs générations de petits sont sorties de cette souche. Ni les mâles ni les petits n'ont présenté la moindre trace de bacilles acido-résistants.

Cependant les bacilles traversent la muqueuse saine du fourreau. — Une autre cage d'élevage a servi à loger d'autres familles de rats, deux mâles et quatre femelles. Aux deux mâles, on avait introduit, dans le fourreau, et sans produire aucune lésion, un peu de matériel très riche en bacilles acido-résistants. Au bout d'un an, ces rats ont été sacrifiés : les femelles étaient saines, les deux mâles étaient infectés. Les ganglions inguinaux, assez gros, renfermaient un grand nombre de bacilles. Il y avait aussi des bacilles dans les ganglions axillaires. Chose curieuse, ni sur le pénis, ni sur le fourreau, on n'a trouvé trace d'infection.

Les arthropodes parasites des rats ne véhiculent pas les germes. — L'hypothèse de la transmission de la maladie par des insectes parasités devait être aussi envisagée. Nos recherches dans cette voie se sont trouvées tout naturellement limitées. La lèpre du rat est une maladie très répandue, puisqu'on

l'a observée dans toutes les parties du monde. Là où elle existe, elle frappe un assez grand nombre d'individus. Si ce sont des insectes piqueurs qui véhiculent la maladie, ces insectes doivent évidemment se rencontrer partout et s'y rencontrer en grand nombre.

Trois parasites du rat réunissent ces conditions; ce sont deux insectes, le pou du rat (*Hæmatopinus spinulosus*), une puce (*Ctenocephalus serraticeps*), et un acarien (*Laelaps echidninus*).

Puces. — Quand elles sont nombreuses dans un élevage, les puces font courir aux animaux de sérieux dangers.

Les souris sont tuées en quelques jours, non point comme on pourrait le croire par un virus que transmettraient les insectes, puisque l'inoculation du sang d'un animal mort à une souris saine ne cause aucun malaise à celle-ci; ce sont les piqûres multiples auxquelles sont en butte les animaux d'expérience qui amènent leur mort, soit par empoisonnement venimeux, soit par anémie grave, comme en témoigne l'augmentation considérable du nombre des poikilocytes et des globules nucléés, soit par suite des deux actions réunies.

Les rats sont moins sensibles que les souris, mais ils succombent aussi, quoique moins vite, quand les puces sont nombreuses. Aussi doit-on veiller soigneusement à en limiter la pullulation dans les bocaliers d'expériences.

Nos recherches pour découvrir des bacilles dans le tube digestif ou les organes des puces qui s'étaient nourries sur des animaux sérieusement infectés, sont toujours restées vaines.

Poux. — En écrasant sur lame des poux prélevés sur des animaux infestés, nous y avons bien découvert des bacilles acido-résistants, mais différant assez sérieusement d'aspect avec les bacilles de la lèpre. Ils sont plus gros, plus courts, avec des extrémités plus arrondies et ne possèdent que des propriétés acido-résistantes atténuées. A côté d'articles franchement rouges après action de l'acide azotique au dixième, on en trouve d'autres qui sont violets ou même totalement bleus.

Pensant qu'il ne fallait pas accorder trop d'importance aux caractères morphologiques, nous avons fait passer des poux d'animaux malades sur des animaux sains. Quand nous avons

opéré avec des rats gris, rats que nous avons cependant pris la précaution de choisir très jeunes, nous avons observé qu'un certain nombre d'entre eux après six ou huit mois étaient porteurs de bacilles acido-résistants typiques dans leurs ganglions. Mais outre que tous les animaux d'une même expérience n'étaient pas malades, toutes les tentatives faites pour provoquer l'infection chez des rats blancs d'élevage sont demeurées infructueuses.

Il faut donc croire à une infection discrète des rats gris, infection qui s'est accusée au laboratoire avec le temps. Un certain nombre d'autres rats choisis de même et conservés dans les mêmes conditions, mais sans être soumis à une phthyriase expérimentale, étaient infectés dans de semblables proportions après six ou huit mois de séjour au laboratoire.

Lœlaps. — Chez les Lœlaps, trois espèces de bacilles *A. R.* ont été rencontrés : 1° un bacille court et trapu, ayant tous les caractères de celui du pou ; 2° un bacille long, filamenteux, extracellulaire non alcoolo-résistant ; 3° en grand nombre, quand il existe un bacille intracellulaire, alcoolo et acido-résistant qui morphologiquement rappelle celui du rat. Des expériences en cours établiront s'il s'agit d'un germe particulier ou du bacille de Stefansky. Les Lœlaps infectés, 2 p. 4.000 environ, se trouvent aussi bien sur des rats malades que sur des rats sains. Les élevages de rats blancs sont envahis par ces acariens et jamais un cas de lèpre spontanée ne s'y est montré.

Sarcoptes. — Jolly, Mugliston, ont fait jouer aux acariens de la gale un rôle important dans la transmission de la lèpre humaine. La gale est une maladie commune des rats ; c'est une affection aussi répandue que la race murine elle-même, il convenait donc de rechercher son influence dans la diffusion de la lèpre. Pour élucider la question, nous avons fait vivre dans la même cage des animaux atteints de la gale et de lèpre cutanée et des animaux sains. Voici une expérience qui a été conçue sur ce thème :

Exp. VII. — 4 novembre 1909. Un rat d'expérience mâle, chez lequel on constate la présence de nombreux acido-résistants au point d'inoculation, situé à la base de la queue, est enfermé dans un bocal avec 4 rats blancs

femelles. Ce rat porte un peu de gale à l'un des points d'élection, c'est-à-dire à la queue et au voisinage du point contaminé, on n'en voit pas encore ni au nez, ni aux oreilles.

29 janvier 1910. — Un des rats blancs meurt. On trouve sur lui des puces et des poux qu'on écrase sur lame et dans lesquels par coloration on ne découvre aucun A. R. Le rat présente également quelques signes de gale à la base de la queue.

On fait des frottis par grattage au bistouri des faces superficielles et profondes de la peau. Aucun A. R. n'est rencontré dans ces frottis, pas plus que dans les ganglions de l'aîne et de l'aisselle.

4 février. — Un autre rat blanc meurt avec les mêmes accidents et les mêmes parasites que le précédent. Les ganglions inguinaux sont volumineux, mais on n'y trouve, pas plus d'ailleurs qu'aux différents points de la peau explorés, trace d'A. R.

10 février. — Le rat gris infecté meurt. Il porte de très nombreux A. R. au point d'inoculation et dans le voisinage. A la base de la queue, sous la peau remplie de sarcoptes on trouve des bacilles en très grande quantité. Le tissu conjonctif depuis le lien d'inoculation jusqu'aux ganglions inguinaux des deux côtés renferme des A. R. Les ganglions eux-mêmes ne sont pas volumineux, mais renferment cependant un très grand nombre de microbes spécifiques.

25 février. — Le troisième rat blanc meurt. Il est complètement galeux, mais ne porte pas trace de lèpre. On ne trouve chez lui, malgré de nombreux examens, aucun bacille de Stefansky.

18 mars. — Le dernier rat, couvert de gale, est sacrifié. Pas d'A. R.

Comme on le voit par cette expérience, en passant d'un animal à l'autre les sarcoptes n'emportent pas avec eux de bacilles de Stefansky, même quand ils proviennent d'une région infectée. Cette observation est d'accord avec les prévisions qu'on pouvait faire. Les sarcoptes vivent dans l'épaisseur de l'épiderme; parfois, à la vérité, ils pénètrent dans le derme, mais ils sont logés dans leurs sillons et ne changent pas d'hôtes. Sauf les cas où les animaux parasites les retirent et les projettent sur d'autres par grattage, c'est par les larves que la gale se transmet d'un animal à l'autre. Ces larves passent d'un bocal où se trouvent des rats galeux à un bocal voisin contenant des animaux sains. Elles se font véhiculer par des arthropodes qui grimpent sur le verre. Nous avons vu deux larves de sarcoptides que malheureusement nous n'avons pu faire déterminer, sur les pattes d'un *Laelaps*.

L'expérience que nous rapportons ci-dessus a été corroborée par un très grand nombre d'observations faites tant au cours d'expériences pratiquées spécialement avec des animaux galeux, qu'à l'occasion de plusieurs autres dans lesquelles la gale est

intervenu comme un épisode et a atteint non seulement les animaux inoculés, mais des témoins conservés avec eux.

On peut donc dire que le sarcopte de la gale ne véhicule pas ordinairement la lèpre. Mais il n'entre pas dans nos intentions de dénier toute influence à la gale dans la transmission de la maladie de Stefansky. On a vu, par les expériences d'inoculation rapportées plus haut, qu'il suffisait d'un bacille bien placé pour provoquer une infection.

La gale ouvre une porte d'entrée par laquelle la maladie peut s'introduire, si la peau excoriée vient au contact d'une source microbienne comme en portent les rats atteints de lèpre ouverte.

Demodex. — Nous n'avons pas pu vérifier par l'expérience l'hypothèse ingénieuse de Borrel, et rechercher le rôle des Demodex comme agents de dissémination. Certes, les Demodex ne manquent pas chez les rats et, dans nos très nombreuses coupes, nous en avons rencontré beaucoup; mais nous n'avons jamais observé de rapports étroits entre ces acariens et les germes qui s'accumulent en quantité si grande autour des glandes sébacées et des follicules pileux.

Il ne nous paraît pas impossible, si ces Demodex, passant à l'état de larves d'un animal à l'autre, emportent avec eux quelques bacilles comme l'a vu parfois Borrel, qu'ils puissent communiquer la lèpre aux animaux qu'ils parasitent. La facilité avec laquelle nous avons obtenu la contamination de nos rats d'expérience, plaide tout à fait en faveur de cette opinion. Mais pour que les Demodex servent d'agents de transmission, il faut un concours de circonstances qui ne doit pas se produire souvent. La maladie de Stefansky est trop répandue pour n'avoir que cet unique moyen de contag.

Morsures et contacts septiques servent à la propagation. — L'influence d'un contact septique est certainement beaucoup plus grande. Nous avons essayé à plusieurs reprises de la mettre en évidence, mais nos expériences ne nous ont pas donné de résultats assez nets pour que nous soyons autorisés à les rapporter ici. Nous poursuivons d'ailleurs dans cette voie toute une série de recherches sur lesquelles nous reviendrons plus tard.

Un phénomène que nous avons en tout cas observé couramment, augmente singulièrement les chances de contagé. Quand ils sont enfermés dans une même cage, les rats gris se battent fréquemment, non point comme les souris quand on réunit deux élevages, mais chaque fois qu'une cause de trouble ou de frayeur se produit. Les animaux malades sont souvent en butte à l'hostilité de ceux qui sont bien portants. Aussi, quand on introduit un rat lépreux et ulcéré avec des jeunes, confiant dans sa force et pour prévenir une attaque, il se jette en général sur ses congénères et les blesse, ou même parfois les tue. Les plus faibles se disposent en groupes pressés dans un coin de la cage et cherchent à se cacher les uns derrière les autres. Ce mode de groupement est d'ailleurs, on le sait, la règle pour tous les animaux de l'espèce murine.

Ces mœurs à la fois batailleuses et craintives sont propres à assurer d'une part la sortie des germes, et, d'autre part, leur diffusion. Les blessures qu'on observe le plus facilement sur les rats capturés sont à la queue ou chez les mâles à la peau des bourses. Le siège de ces portes d'entrée explique assez bien que la maladie se transmette fréquemment à l'arrière-train, et que les ganglions inguinaux soient si souvent atteints.

Pour nous assurer que des blessures de cette espèce peuvent permettre l'infection, nous avons pratiqué, sur un certain nombre d'animaux, avec la pointe d'un bistouri, des entailles à la peau, comme pourraient le faire les incisives des rats. Sur ces petites plaies nous avons très légèrement, et sans enlever les poils, passé un tampon de coton trempé dans un liquide septique.

Exp. VIII. — Le 27 juillet 1911, on prélève sur un rat d'égout un peu de tissu conjonctif rempli de bacilles A. R., on le broie en eau physiologique et on le conserve à la glacière jusqu'au 16 août. A cette date, avec un bistouri on transperce la peau de 4 rats. La pointe de l'instrument a pénétré un peu dans les muscles de la région fessière droite. Avec un tampon de coton imbibé du liquide infectieux extrait de la glacière, on mouille légèrement les poils des animaux blessés au droit de la porte d'entrée qui vient d'être faite.

25 décembre 1911. — Un rat meurt. Il porte des bacilles A. R. au point d'inoculation et dans les ganglions inguinaux, qui sont d'ailleurs assez petits.

5 janvier 1912. — Un deuxième rat succombe. Bacilles A. R. dans les ganglions inguinaux droits et gauches. Plus abondants à droite.

9 janvier. — Décès d'un troisième rat qui, comme les deux précédents, a des A.R. dans les ganglions inguinaux.

23 février 1912. — La mort du dernier rat se produit ce jour. On trouve dans les ganglions inguinaux de très nombreux A.R.

Cette expérience, comme celles qui ont été rapportées plus haut, montre la facilité avec laquelle peut se faire et doit se faire dans la nature la contamination des rats chez lesquels on trouve des bacilles spécifiques dans les ganglions de l'aîne.

De nombreuses observations faites sur des rats trouvés spontanément infectés contribuent fortement à établir le rôle des blessures superficielles de la peau dans la transmission de la maladie. Il arrive très souvent qu'on trouve le tissu conjonctif périmammaire infiltré de pigment noir. Ce pigment est d'origine hématique, comme l'indique la réaction au ferrocyanure de potassium. Or, presque chaque fois qu'existe cet apport pigmentaire, il y a infection lépreuse. Cette coïncidence est même si commune que nous pouvons presque à coup sûr prévoir l'existence de bacilles d'après la couleur de la région mammaire. Or, ce pigment ferrique se dépose dans le tissu conjonctif périganglionnaire et dans les ganglions quand on produit une blessure superficielle de la peau, comme on peut le voir dans l'expérience II rapportée plus haut. Sa présence chez des rats spontanément infectés indique donc très vraisemblablement que les bacilles se sont introduits par une plaie superficielle de la peau ayant existé sur le territoire drainé par les lymphatiques du ganglion malade.

Contamination axillaire. — L'infection des ganglions axillaires se fait aussi par morsures, nous en avons eu des preuves indéniables, par envahissement bacillaire de cicatrices récentes, chez des rats sauvages. Mais elle peut aussi emprunter une autre voie.

Certains auteurs ont pensé à l'infection par les oreilles ou le museau, qui sont fréquemment atteints de gale. Mais la porte d'entrée est ici moins perméable qu'à la queue. La présence des sarcoptes dans ces régions détermine la formation de véritables épithéliomas par prolifération des cellules de Malpighi. Des excroissances cornées quelquefois très proéminentes s'élèvent sur le nez et les oreilles, et couvrent les sillons.

D'autre part, toutes nos recherches pour trouver des bacilles dans les oreilles sont restées vaines.

L'infection n'a pu être produite au travers de la pituitaire. — G. Dean signale la présence de germes spécifiques dans le mucus nasal des rats lépreux, nous n'avons pas eu de peine à vérifier l'exactitude de cette observation.

L'auteur anglais, appliquant au rat l'hypothèse énoncée par Jeanselme et Laurens (1), et plus tard par Sticker (2), pense que la pituitaire est une voie d'excrétion bacillaire et une voie naturelle de contamination. Nous ne partageons pas cette opinion. Une expérience qui, à la vérité, nous a surpris par ses résultats, nous a montré la résistance de la pituitaire à l'infection.

Nous avons frotté vigoureusement jusqu'à amener un petit écoulement sanguin, les narines droite et gauche de 12 jeunes rats avec un bout de coton imbibé de matériel septique qui a servi à en infecter 24 autres. Aucun d'eux n'a été trouvé porteur de bacilles ni dans le nez, ni dans les ganglions cervicaux, ni ailleurs.

C'est donc par une autre voie que se fait l'infection des ganglions axillaires.

Infection pulmonaire d'emblée par les voies digestives. — Dans un lot d'animaux provenant d'un clos d'équarrissage, il nous est arrivé d'en rencontrer un certain nombre chez lesquels on trouvait des bacilles dans l'aisselle en grande quantité et peu ou pas du tout dans l'aine.

Chacun d'eux avait aussi des A. R. dans le poumon et les ganglions médiastinaux, phénomène qui ne doit pas surprendre si on veut se reporter à ce que nous avons dit au chapitre de l'anatomie pathologique.

Cependant un de ces animaux avait des A. R. seulement dans le poumon et les ganglions médiastinaux, point du tout ailleurs. De nombreux et soigneux examens nous permettent de l'affirmer.

(1) JEANSELME et LAURENS, Des localisations de la lèpre sur le nez, la gorge et le larynx. *Soc. méd. des Hôp.*, 1897, 23 juillet.

(2) STICKER, Mittheilungen über Lepra nach Erfahrungen in Indien im Egypten. *Münch. med. Wochens.*, 28 septembre-5 octobre 1897 et *Lepra Conferenz*. Berlin, 1897, 1^{re} partie, p. 99.

D'où vient cette localisation intrathoracique ? L'expérience ci-dessous en donne l'explication.

En faisant absorber à de petits rats des aliments infectés de bacilles A. R., nous avons reconnu qu'on provoque parfois une infection primitive du poumon.

Exp. IX. — Le 1^{er} juillet 1940, un rat d'expérience 55 est sacrifié. Il porte un volumineux nodule à A. R. qu'on broie dans l'eau physiologique stérile. De ce liquide très riche en bacilles on fait boire deux gouttes à huit petits rats blancs âgés de vingt-quatre jours.

12 octobre. — Un des rats est mort. Pas d'A. R. dans les ganglions superficiels, ni dans les ganglions mésentériques qu'on recherche avec soin et dont on examine attentivement plusieurs.

Il est un fait assez remarquable, c'est que les rats d'expérience qui ont maintenant quatre mois sont restés notablement plus petits que des rats de cet âge et même que des jeunes rats nés trois semaines après eux.

16 octobre, 9 heures. — Un des petits rats meurt sans A. R. dans les ganglions mésentériques, le foie ou la rate.

1^{er} décembre. — Un troisième rat est trouvé mort dans le bocal d'expérience. Il est putréfié tellement qu'on ne peut examiner les organes abdominaux. En ouvrant le thorax, on remarque que les ganglions médiastinaux sont volumineux. Ils sont examinés et on y trouve un grand nombre d'A. R. Des frottis sont aussi préparés avec des fragments des poumons prélevés à différents endroits. Dans ceux qui ont été faits avec de la pulpe des sommets, on rencontre un nombre relativement faible d'A. R. dont quelques-uns sont disposés en groupes de trois ou quatre.

2 décembre. — Un quatrième rat est mort aujourd'hui. L'autopsie complète en est faite avec grand soin. Comme dans le précédent, les frottis des ganglions médiastinaux et des sommets pulmonaires renferment des A. R. Dans la pulpe des deux poumons prise à la partie moyenne ou à la base, point de bacilles. Tous les ganglions mésentériques qu'on peut trouver servent à faire des frottis. Dans un d'entre eux, quelques bacilles A. R. peu nombreux sont rencontrés. Rien par ailleurs.

16 décembre. — Décès d'un cinquième rat, dans lequel on ne trouve point d'A. R.

5 mars 1941. — Le sixième rat meurt sans A. R.

21 avril. — Les deux derniers rats sont sacrifiés. Aucun A. R. chez eux. Ces rats de onze mois étaient restés de petite taille.

Voilà donc des rats d'élevage, nés au laboratoire et par conséquent indemnes de toute contamination spontanée, qui ont simplement absorbé des bacilles, en grand nombre il est vrai, et qui ont présenté une affection pulmonaire primitive. Dans la paroi de l'œsophage, dans celles de l'estomac et de l'intestin on n'a trouvé aucun dépôt bacillaire.

Les ganglions mésentériques n'étaient point particulièrement volumineux et dans la plupart des cas n'étaient point infectés.

Mais chez deux d'entre eux l'infection s'est faite beaucoup plus loin.

Comment expliquer cette immunité relative des ganglions de la région qu'a traversée le virus et le transport des bacilles au poumon? Tout s'est passé comme si les ganglions mésentériques ne recevaient que les lymphatiques de la paroi intestinale, ceux des villosités se dirigeant vers le canal thoracique. Quant au mode d'introduction des bacilles, on peut le concevoir par la rentrée dans le circuit lymphatique de quelques-unes des cellules migratrices qui existent si nombreuses dans la lumière intestinale, et qui auraient absorbé un certain nombre de bacilles. Retenues ensuite par le filtre pulmonaire, elles ont servi à l'infection des ganglions médiastinaux.

Il faut aussi compter avec l'existence de quelques zones dénudées d'épithélium le long du trajet de l'intestin. Le fait que l'infection ne se produit pas dans tous les cas plaiderait en faveur de cette hypothèse. Faut-il enfin admettre que ce bacille immobile peut passer au travers des muqueuses saines, comme il passe au travers de la peau épilée? Il nous est impossible pour le moment de prendre parti dans la question. Des expériences en cours nous renseigneront peut-être plus tard.

Quel que soit le mode de pénétration des germes, la paroi intestinale une fois franchie, la majeure partie des cellules parasitées se rend, non dans les ganglions mésentériques, mais dans le canal thoracique, voie par laquelle elles gagnent le poumon.

Il est vrai qu'on peut faire une autre hypothèse pour expliquer cet envahissement pulmonaire précoce et admettre que l'infection passe par les premières voies digestives.

Mais en ce cas on devrait rencontrer des bacilles dans les ganglions cervicaux aussi bien que dans les ganglions médiastinaux. C'est une constatation que nous n'avons pas faite. La localisation des bacilles et l'absence de germes dans la sous-muqueuse œsophagienne nous portent à écarter cette interprétation. Nous sommes au contraire conduits à regarder comme probable la pénétration au travers de l'intestin, puisque nous avons dans un cas trouvé des bacilles dans un ganglion mésentérique.

Cette observation d'infection pulmonaire dans la lèpre du

rat après ingestion de matériel septique concorde avec les faits signalés par Calmette dans la tuberculose. Dans cette maladie comme dans la lèpre, le bacille spécifique, par la voie lymphatique, arrive très vite au poumon, mais le bacille tuberculeux, parce qu'il est toxique et qu'il immobilise rapidement la cellule hôte, reste dans le poumon au lieu d'être évacué sur les ganglions.

Comment se contaminent dans la nature ces rats sauvages? Nous avons pu observer que les murins nourris avec de la viande, même quand ce sont des rats blancs d'élevage, perdent cette humeur douce qui les fait rechercher dans les laboratoires. Ils deviennent batailleurs et mordent fréquemment ceux qui les soignent.

Des rats sauvages vivant dans un clos d'équarrissage, se nourrissent évidemment de la viande des animaux abattus. Les batailles parmi eux doivent devenir plus fréquentes, et bien des animaux parasités qui, nous le savons, sont souvent en butte aux attaques des rats sains, succombent dans ces luttes et sont dévorés par les vainqueurs. Par la voie digestive, comme aussi par les pattes antérieures, qui sont chez le rat des organes de préhension, l'infection peut passer assez facilement aux animaux sains et gagner poumons et ganglions axillaires.

Une autre hypothèse dont nous n'avons pas encore pu établir la valeur, se présente naturellement à l'esprit : le bacille qui contamine le rat peut vivre aussi dans les débris de viande que dévorent les rats. Si ce fait était établi, il expliquerait assez bien pourquoi on trouve en plus grand nombre les rats lépreux dans les abattoirs, les dépôts d'os et les clos d'équarrissage.

L'alimentation carnée n'influe pas sur la marche de la maladie. — Nous avons cru qu'il fallait attribuer à l'alimentation carnée la propriété de favoriser le développement des germes chez les animaux infectés et l'apparition des stigmates de lèpre.

Pour nous en assurer, nous avons organisé une expérience sur quarante-deux rats blancs qui tous ont été infectés par badigeonnage septique de la peau du dos épilée. Ces animaux ont été partagés en deux lots de vingt et un, dont l'un a reçu

comme alimentation du pain mouillé et du grain, l'autre du grain et de la viande crue.

Nous ne rapporterons pas dans le détail cette expérience qui a duré près de huit mois. En voici les résultats.

Comme dans toutes nos expériences, la plupart des rats sont morts spontanément de cette pseudo-tuberculose qui nous enlève tant de sujets d'expérience. Un certain nombre d'entre eux ont succombé avant que l'infection par les bacilles A. R. soit facilement perceptible.

Sur les rats nourris avec de la viande l'infection s'est révélée plus tardivement; le premier animal pris n'a été vu que quatre mois après le début de l'expérience, alors qu'au bout de deux mois l'infection était diagnosticable chez les animaux nourris avec des hydrates de carbone. Du quatrième au huitième mois, les rats à viande étaient porteurs d'un plus grand nombre de bacilles que les autres, mais la proportion des malades a été finalement plus grande chez les rats à hydrates de carbone (66,6 p. 100, contre 50 p. 100 chez les autres). Il ne faut pas attacher à cette dernière conclusion une importance très grande parce qu'elle découle naturellement du fait que ces animaux ont été porteurs de bacilles d'une façon plus précoce. Ceux qui sont morts entre le deuxième et le quatrième mois sont naturellement venus corser la statistique, puisque le premier malade dans la série à viande ne s'est montré qu'à cette dernière époque. En somme, le régime carné n'a pas d'influence sur le développement de la maladie lépreuse des murins.

Chez tous ces rats, comme chez la majeure partie de ceux que nous avons contaminés expérimentalement, les ganglions malades n'étaient pas augmentés de volume et l'infection n'avait point, comme dans la maladie spontanée, gagné les tissus voisins.

On peut se demander tout d'abord si le gonflement ganglionnaire est bien sous la dépendance de l'infection bacillaire, comme tendrait à le faire croire l'examen des animaux spontanément atteints de lèpre. Il est permis d'en douter. L'hypertrophie des ganglions est tellement commune chez les rats d'égoûts qu'il ne faut guère s'étonner de la rencontrer souvent sur les rats lépreux. Cette adénite n'est d'ailleurs pas, comme nous l'avons écrit au début de ce mémoire, aussi constamment

observée dans la lèpre que certains auteurs l'ont prétendu. En tout cas, elle n'autorise pas un diagnostic que seul l'examen microscopique permet de porter.

L'inoculation de virus pur donne toujours la forme ganglionnaire. — La localisation presque exclusive et constante de l'infection aux ganglions indique qu'il manque chez les rats d'expérience un facteur favorisant qui se rencontre dans la nature pour produire la lèpre vraie. La détermination de ce facteur a été pour nous pendant longtemps un problème obsédant dont la solution nous a été apportée par une expérience que nous relatons ci-après.

L'inoculation impure produit la forme musculo-cutanée. — L'un de nous, ayant obtenu en milieu impur la culture d'un bacille acido-résistant qui peut être le bacille de Hansen (1), et étant convaincu du rôle des infections secondaires dans la généralisation de la lèpre humaine (2), plusieurs expériences furent entreprises pour rechercher l'action des inoculations impures sur le développement de la lèpre des rats. L'inspiration était bonne, comme le prouve celle qui suit et que nous donnons à titre d'exemple.

Exp. X. — Le 18 décembre 1909, un rat blanc d'expérience 52, est sacrifié.

On en retire du matériel septique, ganglions et tissu conjonctif, qui, par broyage dans l'eau physiologique, donne un liquide très riche en A.R. A ce liquide est ajouté un peu d'une culture en gélose d'un coccus retiré du mucus nasal d'un lépreux. Avec ce mélange, six rats blancs sont inoculés sous la peau du dos à la base de la queue.

26 décembre. — Tous les rats portent une plaque d'induration au point où ils ont reçu le virus impur. Tous ont des ganglions inguinaux gros et durs.

3 janvier 1910. — Un des rats est sacrifié. Il porte de gros ganglions, mais aucun des frottis faits avec la pulpe qui en est retirée ne renferme d'A.R. Au point d'inoculation, on en retrouve un certain nombre.

18 juin 1910. — Un rat meurt ce jour. Au point d'inoculation, il porte une plaque de tissu conjonctif chagrinée, très fortement adhérente en son milieu aux tissus sous-jacents. Les ganglions inguinaux sont volumineux.

Dans le nodule d'inoculation, il y a une très grande quantité d'A.R., de

(1) MARCHOUX, Culture d'un bacille acido-résistant provenant du mucus nasal des lépreux. *Bull. Soc. de Path. exot.*, t. IV, 1911, p. 89.

(2) MARCHOUX, *Les migrations du bacille de la lèpre*. II^e conférence de la lèpre, Bergen, 1910, III^e vol., p. 57.

même que dans les ganglions. On en trouve aussi par raclage de la partie profonde de la peau entre le point d'inoculation et les ganglions.

Le paquet ganglionnaire de l'aisselle renferme aussi une notable quantité d'A. R.

6 juillet. — Un troisième rat succombe. Au point d'inoculation, il porte une plaque de la dimension d'une pièce de 1 franc formée de tissu conjonctif épaissi et chagriné.

Les A. R. fourmillent dans les frottis faits avec les produits de raclage de ce nodule.

Tout autour les tissus paraissent normaux, mais ils renferment une notable quantité de bacilles.

C'est surtout à la face ventrale que se trouvent les lésions les plus étendues et les plus caractéristiques. Deux larges bandes de tissu conjonctif épaissi et chagriné entourent les ganglions inguinaux et forment comme un plastron qui double la peau à la région ventrale d'un flanc à l'autre. Ce plastron se prolonge en avant par de longues ailes de forme vaguement triangulaire, qui s'étendent de chaque côté de la ligne blanche jusqu'au thorax. Du côté droit, le plastron basal est plus large et l'aile antérieure plus longue, elle atteint l'aisselle.

Les ganglions de l'aîne et de l'aisselle sont tous tuméfiés.

Dans ces tissus lésés et dans les ganglions se trouve une masse énorme de bacilles spécifiques, en nombre aussi considérable que dans la maladie naturelle.

Il y a des A. R. dans les poumons, les ganglions médiastinaux. On en trouve aussi dans la rate, le foie et dans un ganglion mésentérique.

27 juillet. — Décès d'un quatrième rat, pour lequel on ne peut trouver la cause de la mort, ni par examen direct ni par ensemencement du sang ou des organes. Cet animal porte aussi au point d'inoculation une large plaque de tissu conjonctif épaissi et bourré d'A. R. Il existe en avant des groupes ganglionnaires inguinaux des lésions macroscopiques, mais moins importantes que chez le rat précédent. Il y a également chez cet animal une infection discrète du foie et de la rate.

9 août. — Les deux rats qui restent sont aveugles. Les trypanosomiasés amenant assez fréquemment de la cécité, on cherche chez eux des trypanosomes sans en trouver. Les deux animaux sont sacrifiés. Ils sont porteurs de lésions spécifiques semblables à celles des deux rats précédents.

Chez le premier, le plastron ventral, un peu plus étendu que sur le rat mort le 27 juillet, l'est cependant moins que sur celui qui a succombé le 18 juin. La lésion est surtout importante à droite. Tous les ganglions superficiels de l'aîne et de l'aisselle sont hypertrophiés et remplis de bacilles. Lésions discrètes du foie et de la rate.

Le deuxième rat est porteur de lésions semblables, mais un peu moins étendues.

En faisant un frottis de la cornée opacifiée, on y trouve une grande quantité d'A. R.

Cette expérience a été vérifiée par plusieurs autres dont les résultats ont été les mêmes, quoique moins remarquables. C'est parce qu'elle a été particulièrement démonstrative que nous l'avons rapportée ici. Pour les autres expériences, ce n'est pas

le même microbe d'impureté qui a servi. Chaque fois, il s'agissait d'un staphylocoque pyogène, mais différent. Ces expériences de vérification ont été accompagnées de témoins. En même temps qu'était faite l'inoculation impure à une série d'animaux, une autre recevait le liquide de broyage sans addition de germes étrangers. Sans doute, même dans ce cas, il ne peut être question de pureté absolue, car au cours de la préparation du liquide, malgré l'emploi de verres, de baguettes et d'eau physiologique stériles, il s'introduit des germes étrangers, mais ceux-ci, ou bien ne sont pas pathogènes et par conséquent sont immédiatement détruits, ou bien sont en trop petit nombre pour exercer une action importante.

Sur les témoins, il n'a été observé aucun symptôme de généralisation. Comme toujours, l'infection était limitée aux ganglions, restés de faible volume, et parfois au point d'inoculation.

On peut donc admettre que dans la nature, les mêmes phénomènes se représentent et qu'il faut, pour causer cette lèpre musculo-cutanée, le concours d'une impureté.

Le fait est que chez les rats malades on rencontre presque toujours des lésions pyogènes, des abcès produits par des microbes étrangers, des staphylocoques souvent. Une fois même, dans des coupes de la peau œdématiée, nous avons trouvé une infiltration de staphylocoques qui avait fusé dans le tissu conjonctif et provoqué un œdème avec diapédèse intense de polynucléaires.

En revanche, chaque fois que nous avons trouvé des rats à infection limitée aux ganglions, la peau était très nette et rien autre que le microscope ne permettait de porter un diagnostic.

PARALLÈLE ENTRE LA LÈPRE HUMAINE ET LA LÈPRE DU RAT.

Si nous voulons établir entre la lèpre humaine et la lèpre du rat un rapprochement que légitime la similitude des deux affections, nous pourrions, d'après ce qui précède, formuler sur la maladie de l'homme quelques hypothèses qui en éclaireront singulièrement l'épidémiologie.

Infection hansénienne et lèpre ne sont peut-être pas synonymes. — Tout ce qu'on connaît sur la lèpre concourt à

désigner le revêtement cutané comme le siège de la première inoculation. Nous venons de voir qu'il en est de même pour le rat.

La moindre érosion de la peau suffit au bacille de Stefansky pour pénétrer dans l'organisme. Le bacille de Hansen se comporte peut-être bien de la même façon. La difficulté apparente de contagion de la lèpre ne serait qu'une illusion. Comme chez le rat, infection ne signifierait pas toujours maladie. Il pourrait y avoir, dans les pays à lèpre, beaucoup plus de personnes atteintes qu'on ne le suppose, mais chez la plupart le bacille spécifique cantonné dans un coin de l'organisme y sommeillerait longtemps et souvent pendant toute la vie de l'hôte insoupçonné qui l'héberge.

Les autopsies de gens vivant au voisinage de malades, peuvent seules renseigner sur la réalité des faits dont nous émettons la supposition. Il conviendrait de rechercher les germes dans les ganglions superficiels et dans les ganglions médiastinaux, ces derniers étant sans doute, chez l'homme comme chez le rat, un réservoir où se déversent les bacilles venant de tous les points de l'organisme.

Ces lépreux latents deviendront des lépreux avérés quand une impureté favorisante aura pénétré dans leur organisme ou quand une cause de déchéance physique aura diminué leur résistance. Ce serait à de longues somnolences des germes qu'il faudrait attribuer ces incubations prolongées si fréquemment citées. Ce serait à la lèpre latente qu'il faudrait faire remonter ces cas erratiques qui surgissent tout à coup dans une région sans qu'il soit possible d'en établir la filiation.

Chez l'homme, sans doute, comme chez le rat, la lèpre marche vite quand elle succède à une inoculation impure qui a provoqué une suppuration; elle évolue tardivement quand les germes sont restés inclus dans les organes lymphatiques et qu'une cause accidentelle vient les réveiller de leur long sommeil.

Le contact septique est probablement la cause de l'infection.

— Le transport et l'inoculation des germes par les insectes piqueurs ne méritent sans doute pas plus d'attention pour la maladie humaine que pour la maladie murine. Quant à la gale,

elle peut exercer une certaine influence, par les lésions de la peau qu'elle cause. Rien ne s'oppose à ce que le *Demodex* soit un agent de transport.

La pénétration des germes par les voies digestives est beaucoup plus difficile à admettre, elle se fait seulement quand des masses considérables de germes traversent l'intestin. Si cette éventualité a des raisons de se produire chez les rats qui se mangent entre eux, il n'en est pas de même pour l'homme, qui n'ingère de germes qu'à l'état d'unités et par conséquent sans courir de grands risques.

Chez l'homme, comme chez le rat, le mode de contagion habituel est sûrement le contact, mais un contact intime qui n'a plus que de rares chances de se produire avec la civilisation européenne actuelle. C'est parce que le voisinage des malades dans les hôpitaux est bien loin de l'antique promiscuité, que nous ne voyons plus les cas de lèpre essaimer comme au moyen âge. Nos malades hospitalisés ne couchent plus à huit dans le même lit et portent des vêtements qui leur sont propres.

En dehors des rapports sexuels, les contacts corporels ont bien peu de chances de se produire entre les membres de la population parisienne. Il n'en est point de même dans les pays où la lèpre se multiplie encore. Nous avons constaté une singulière promiscuité à Saint-Dalmas-de-Valdeblore, où l'un de nous, en collaboration avec Bourret (1), fit une enquête dans un petit foyer de lèpre encore en activité. C'était dans une maison d'une malpropreté insigne, où les lits n'étaient sans doute jamais faits, et les draps, autant que nous en pûmes juger par la couleur, jamais changés. Les habitants de cette maison au nombre de quatre, auraient pu avoir chacun leur chambre, le nombre des pièces le permettait, cependant ils couchaient deux à deux. La mère lépreuse partageait son lit avec son fils, un grand gaillard de dix-sept ans et de 1^m80 de hauteur, et n'y voyait point de mal. Deux sœurs, dont une lépreuse, dormaient ensemble.

Ces conditions se rencontrent encore très souvent dans nos colonies, non seulement parmi les indigènes, mais aussi parmi les

(1) MARCHOUX et BOURRET, Enquête étiologique dans un foyer de lèpre. *Bull. de la Soc. de Path. exot.*, t. I, 1908, p. 288.

Européens, qui perdent très vite dans le milieu où ils vivent les principes d'éducation et d'hygiène élémentaire qu'on a eu tant de peine à leur enseigner en France.

Elles se trouvent aussi réunies pour les membres d'une même famille. Dans beaucoup de pays les conjoints n'ont qu'un seul lit et couchent souvent leurs enfants avec eux, au moins quand ils sont jeunes. Les mères lépreuses pour soigner et allaiter leurs nourrissons les exposent à de grandes chances d'infection. On est même surpris que dans les familles où la mère est malade tous les enfants ne soient pas atteints. Si, comme dans la statistique de Sand (1), on ne relève parmi eux que 10 p. 100 de lépreux, cela ne veut pas dire qu'il n'existe pas des lépreux latents en bien plus grand nombre.

Il faut peut-être aussi, parmi les causes de contagion, faire une place assez large au contact indirect par échange de vêtements et lavage de linges souillés.

Dans les idées traditionnelles qui ont survécu à plusieurs générations, il y a presque toujours une part de vérité. Sous sa gaine glutineuse, le bacille de la lèpre résiste peut-être mieux que celui du rat à la dessiccation. En tout cas, il peut se trouver dans des humeurs encore assez fraîches sur des vêtements qui viennent d'être quittés ou sur du linge qui a récemment essuyé des plaies septiques. Les blanchisseuses, par profession, ont souvent l'épiderme des mains éraillé ou fendu, tout préparé pour recevoir les germes.

L'infection produite chez des rats mâles par simple insertion de bacilles spécifiques dans le fourreau, sans lésion de la muqueuse, semble indiquer que les rapports sexuels impurs soient à redouter comme cause de contagion.

Direct ou indirect, le contact joue sûrement le rôle principal dans l'épidémiologie de la lèpre. Cette importance de l'étroite promiscuité découle de l'efficacité des mesures prises en Norvège, où il a suffi de faire vivre les lépreux à l'écart des personnes saines et sans les éloigner de la maison familiale pour arrêter la lèpre.

(1) A. SAND, *Geschicht die Ansteckung der Lepra durch unmittelbare Uebertragung?* II^e conférence de la lèpre. Bergen, 1910, III^e vol., p. 39.

CONCLUSIONS.

1° Il n'est pas tué par une exposition de cinq minutes à la température de 60 degrés. Il meurt à la même température en un quart d'heure;

2° Si l'infection est plus considérable dans les régions superficielles, c'est qu'elle entre par la peau;

3° Elle suit les trajets lymphatiques;

4° Le point d'inoculation n'est pas toujours la région de la peau la plus infectée;

5° Des mâles s'infectent quand on dépose des bacilles dans le fourreau sans faire aucune lésion de la muqueuse;

6° Cependant la maladie spontanée ne paraît pas se transmettre par la voie génitale;

7° Les insectes ne véhiculent pas la maladie;

8° Les sarcoptes de la gale ne peuvent jouer qu'un rôle indirect dans la diffusion de la lèpre;

9° Le contact d'une peau lésée avec une peau malade ou avec des objets fraîchement souillés est le mode de contagion ordinaire;

10° Une grande quantité de germes introduits par la voie digestive donne une infection primitive du poumon;

11° Les ganglions des rats inoculés artificiellement sont généralement petits, contrairement à ceux des rats spontanément malades;

12° C'est la forme ganglionnaire qu'on provoque toujours par inoculation. Pour donner la forme musculo-cutanée, il faut injecter des produits impurs.

ÉTUDES SUR LE BACILLE DE SCHMORL

(SECOND MÉMOIRE)

EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE

par E. CÉSARI

Le cobaye passe pour quasi réfractaire au bacille de Schmorl : il n'en est rien. Le Dr Girard (*recherches inédites*) a étudié jadis, ici, les îlots nécrotiques que l'on rencontre à l'autopsie de certains sujets et a pu y déceler, par l'examen microscopique et les cultures, la présence du bacille de la nécrose. Mêmes résultats à Mexico, chez un cobaye auquel il avait injecté, dans le péritoine, le sang d'un individu atteint de typhus exanthématique. Voilà pour la *maladie naturelle* ; quant à la *maladie expérimentale*, elle a été de notre part l'objet de recherches suivies et nous espérons en montrer tout l'intérêt dans les lignes qui vont suivre.

Nous étudierons successivement les injections *sous-cutanées*, *intraveineuses* et *intrapéritonéales*.

INJECTIONS SOUS-CUTANÉES

Suivant les conditions expérimentales, on observe divers types cliniques qu'il est *indispensable* de bien connaître. C'est seulement, en effet, après avoir vu se dérouler sous ses yeux les *images variées* qui traduisent les *réactions variées* de l'organisme au bacille de la nécrose (et à sa toxine) que l'on peut tenter de pénétrer plus avant dans la pathogénie des affections dues à ce microbe.

Rien de plus facile que de réaliser les types dont nous parlons. Prenons une culture en bouillon Martin glucosé (2 p. 1.000), culture ayant séjourné vingt-quatre heures à 37 degrés (1).

1) Toute notre étude expérimentale a été faite sur l'échantillon dit *Primus*. Nous nous sommes assuré, préalablement, que les autres races, isolées avec V. Alleaux, déterminaient des effets à peu près identiques.

Injectons 1 cent. cube du liquide, bien agité, sous la peau d'un cobaye (animal de 500-600 grammes) : nous obtenons un type que nous appellerons type C (réaction à la somme : microbes + toxine). Centrifugeons à fond, avec l'appareil de Jouan, la même culture et injectons 1 cent. cube du liquide clair : nous observons le type dit conventionnellement A (réaction à la toxine. — Les quelques corps microbiens restés dans le liquide sont négligeables; on obtient d'ailleurs des effets identiques avec les filtrats, mais il faut forcer la dose). Lavons (une fois) le dépôt de centrifugage à l'eau physiologique et rétablissons le volume initial de la culture avec de l'eau physiologique, puis injectons 1 cent. cube du liquide bien agité : nous réalisons le type E (réaction aux microbes). On obtient tous les types intermédiaires entre A et C (schématisables par un stade moyen, B) en centrifugeant de moins en moins complètement la culture, c'est-à-dire en injectant, avec le liquide clair, des quantités de plus en plus grandes de microbes. Inversement, on réalise tous les types intermédiaires entre E et C (schématisables par un stade moyen, D) en lavant de moins en moins complètement le dépôt de centrifugage, c'est-à-dire en injectant, en plus des corps microbiens, des doses croissantes de toxine.

Nous décrirons d'abord, avec les détails nécessaires, les *types principaux* : A (toxine), E (microbes) et C (toxine + microbes), en mentionnant les *formes dérivées* quantitativement (injection de volumes de liquide supérieurs ou inférieurs à 1 cent. cube, injection de cultures plus ou moins vieilles) et qualitativement (injection de liquides chauffés ou soumis à un centrifugage exagéré). Il suffira, ensuite, de dire deux mots des types B et D, faciles à imaginer.

A la description des types cliniques fera naturellement suite l'étude des conditions qui permettent de les réaliser.

DESCRIPTION DES TYPES CLINIQUES

TYPE A (*Toxine*).

FORME CLASSIQUE. — Elle se caractérise par la production d'une *eschare humide*, à apparition rapide, dont on peut schématiser ainsi l'évolution.

Quelques heures après l'injection (1) (1 cent. cube de liquide clair), on observe un œdème mou, allant du volume d'une noix à celui d'un œuf de pigeon. Sur cet œdème, la peau montre une tache vert pâle, humide, cerclée de rouge sombre, dont la surface répond à celle d'une pièce de 1 ou 2 francs. — *Le lendemain*, l'empâtement hypodermique s'est aplati, la tache cutanée commence à brunir et à sécher par endroits. — *Le surlendemain*, l'eschare est devenue complètement sèche et d'un noir de jais; l'infiltrat sous-cutané forme un disque de consistance rénitente. — *Le 4^e jour*, l'eschare commence à se soulever et on aperçoit un ulcus sec, atone, couleur maigre de jambon. — *Le 5^e jour*, le disque sur lequel reposait la lésion nécrotique s'est très aminci. — *Du 6^e au 7^e jour*, l'eschare tombe; l'ulcus sous-jacent n'est bordé que par un cercle induré étroit. — *Puis*, la perte de substance diminue peu à peu d'étendue et de profondeur et la cicatrisation est accomplie quinze jours environ après l'injection. — En dehors des complications (assez rares), les animaux ne succombent jamais; ils n'offrent qu'une émaciation légère ou même nulle.

FORMES DÉRIVÉES QUANTITATIVEMENT. — Si l'on augmente la quantité de liquide injectée, les lésions augmentent également d'étendue et les complications se montrent plus fréquentes. Si on la diminue, l'empâtement et l'eschare diminuent, jusqu'à ce que, finalement, tout se réduise à un infiltrat modéré, recouvert de croûtelles (auxquelles font suite des érosions superficielles), puis à un simple œdème transitoire.

FORMES DÉRIVÉES QUALITATIVEMENT. — Les liquides chauffés, injectés à dose suffisante, déterminent l'apparition d'un empâtement et d'une eschare aussi marqués que dans le type classique, *mais l'aspect initial diffère*. Le premier jour, simple œdème; le lendemain, *tache violette* plus ou moins foncée selon les cas (souvent très pâle) et à *peine humide*. Puis, *eschare brun foncé*, ulcus, etc., comme dans la forme normale.

COMPLICATIONS. — M. M. Nicolle a fait connaître depuis longtemps les complications que l'on rencontre, chez les cobayes, à

(1) Avant la fin de la première heure, l'eschare s'annonce déjà, *loco læso*, par une teinte bleu-verdâtre des téguments.

la suite de l'injection (et, notamment, de l'injection sous-cutanée) de divers microbes et toxines. Ces complications, générales ou locales, sont dues, habituellement, soit à la *pasteurella*, soit au pneumocoque. Nous croyons inutile de les décrire à nouveau. Disons, simplement, qu'au cours de nos expériences sur les cobayes ce sont surtout les infections secondaires à *pasteurella* que nous avons observées.

TYPE E (*Microbes*).

FORME CLASSIQUE. — Elle se traduit par le développement d'un *bourbillon sous-cutané*, qui évolue schématiquement comme il suit.

Quelques heures après l'injection (1 cent. cube de culture lavée), apparaît un œdème mou, généralement peu étendu et sans mortification de la peau susjacente. — *Le lendemain*, cet œdème dessine une tuméfaction arrondie ou allongée, rénitente, dont le volume oscille entre celui d'une amande et celui d'une noix. — *Le surlendemain*, l'empâtement durcit. — *Le 4^e jour*, on perçoit souvent une fluctuation obscure. — *Le 5^e jour*, la fluctuation, toujours nette, répond à tout ou partie de l'infiltrat hypodermique. — *Du 6^e au 7^e jour*, la ponction donne issue à du pus, entourant un bourbillon plus ou moins adhérent encore aux tissus profonds. Ce bourbillon, qui représente l'exsudat sous-cutané nécrosé en bloc, ne diffère en rien de celui d'un furoncle. Il contient, ainsi que le pus, des bacilles nombreux et caractéristiques. — *Du 8^e au 9^e jour*, si l'on n'a pas ponctionné la peau, on la voit offrir, sur un point limité (tête d'épingle, lentille, au plus), une tache escharotique brunâtre, qui rappelle l'aspect d'une fine brûlure au thermocautère. En ce point, les téguments, très amincis, laissent sortir, par la simple pression, le pus et le bourbillon hypodermiques. — *Du 10^e au 11^e jour*, le bourbillon s'évacue de plus en plus complètement, surtout si on l'aide à se détacher des parties saines. — *Puis*, la cavité se comble peu à peu, à mesure que l'empâtement limitant rétrocede; la suppuration diminue régulièrement et tout est fini quinze à vingt jours après l'injection. — Les complications sont un peu moins rares que dans le type A. Quand elles font défaut, le pronostic est aussi bénin.

FORMES DÉRIVÉES QUANTITATIVEMENT. — Si l'on augmente la quantité de liquide injectée, les lésions augmentent d'étendue et l'eschare apparaît (passage au type D). Une forme pareillement « exagérée », *mais sans eschare*, s'observe aussi, de temps en temps, à la suite de l'injection d'un seul cent. cube (sensibilité plus grande de certains sujets au regard des germes). Dans les deux cas, les phénomènes caractéristiques ne se dessinent d'habitude qu'après quelques jours. La lésion s'accroît alors assez rapidement et il se forme un véritable abcès froid (parfois très vaste) à parois épaisses, dont la marche est lente et qui devient volontiers le point de départ de complications locales et générales.

Si on diminue la quantité de liquide injectée, les lésions diminuent également (pois, lentille), comme il fallait s'y attendre.

FORMES DÉRIVÉES QUALITATIVEMENT. — Si l'on injecte des cultures soumises à un lavage exagéré, on n'observe, pendant plusieurs jours, aucun phénomène réactionnel local. Puis apparaît un nodule qui durcit, fluctue au centre et évolue généralement assez vite. Ses dimensions dépassent rarement celles d'une amande.

COMPLICATIONS. — Plus fréquentes qu'avec le type A, surtout dans les formes « exagérées ».

TYPE C (*Microbes* + *toxine*).

FORME CLASSIQUE. — *Elle représente*, cela va de soi, la somme des types A et E, c'est-à-dire l'*eschare humide unie au bourbillon sous-cutané*. Le bourbillon est mis ici directement à nu, sans suppuration éliminatrice. L'évolution peut être schématisée comme il suit.

Quelques heures après l'injection (1) (1 cent. cube de culture totale), on observe un œdème mou, crépitant (sauf dans le cas des germes qui fermentent peu le glucose), allant du volume d'un œuf de pigeon à celui d'un petit œuf de poule. Sur cet œdème, la peau montre une tache humide, absolument identique à celle qui caractérise le type A. — *Le lendemain*,

(1) Comme dans le type A, on peut déjà percevoir au point injecté, avant la fin de la première heure, un changement de couleur de la peau caractéristique de sa mortification commençante.

l'œdème, stationnaire ou plus étendu, demeure encore habituellement crépitant; l'eschare humide offre l'aspect d'une « peau morte », entourée d'un cercle brun violacé. — *Le surlendemain*, l'infiltrat hypodermique s'allonge et devient plus ferme; l'eschare brunit, sèche et se plisse. — *Le 4^e jour*, l'eschare fonce et se rétracte. — *Le 5^e jour*, elle a pris un ton noir de jais et commence à se soulever; on aperçoit, alors, le bourbillon (exsudat nécrosé en bloc, comme dans le type E) qui tapisse l'ulcus sous-jacent. L'empâtement, ferme, a beaucoup rétrocedé. — *Du 6^e au 7^e jour*, l'infiltration forme un disque qui offre, souvent encore, des prolongements en haut et en bas. L'eschare tombe, entraînant une partie du bourbillon; le reste tapisse un ulcus saignant et se prolonge, sous ses bords, dans le disque qui l'entoure. — *Du 8^e au 9^e jour*, la perte de substance commence à diminuer; elle présente un aspect croûteux. Par pression, on fait sortir du disque et de ses prolongements, s'il en existe encore, des restes d'exsudat nécrosé. — *Du 10^e au 11^e jour*, l'empâtement se réduit à un anneau mince, dépassant à peine les bords de l'ulcus. — *Puis*, celui-ci se cicatrise régulièrement et tout est terminé quinze à vingt jours après l'injection.

Notons que le bourbillon contient des bacilles spécifiques jusqu'à sa complète disparition. — Les complications s'observent plus fréquemment ici que dans les types A et E. A l'autopsie des animaux qui succombent alors, on peut rencontrer des nécroses viscérales (reins, poumons, et surtout foie). En l'absence de complications, le pronostic demeure bénin, bien que l'émaciation soit parfois assez accentuée.

FORMES DÉRIVÉES QUANTITATIVEMENT. — Comparables, *mutatis mutandis*, aux formes correspondantes du type A.

FORMES DÉRIVÉES QUALITATIVEMENT. — *Elles font défaut*, en réalité. Par le chauffage des cultures, on rend effectivement le type C irréalisable et l'on va de plus en plus vers le type A, à mesure que l'action de la chaleur s'accroît davantage.

COMPLICATIONS. — Fréquentes et précoces, dès que l'on dépasse 1 cent. cube de culture.

TYPES B ET D.

Il est facile de concevoir ce qui a lieu quand on va du type A vers le type C. *L'eschare demeurant la même*, on voit le bourbillon apparaître et augmenter de plus en plus. On imagine sans peine ce que sera le type B, situé à mi-chemin.

Il est non moins facile de concevoir ce qui a lieu quand on va du type C vers le type E. *Le bourbillon demeurant le même*, on voit l'eschare diminuer de plus en plus. On imagine sans peine ce que sera le type D, situé à mi-chemin.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES
RÉALISANT LES DIVERS TYPES CLINIQUES

INJECTION DE LIQUIDES CLAIRS
(ou, à doses plus grandes, de filtrats).

Cultures de 24 heures. Nous avons dit qu'avec 1 cent. cube on réalise le type A classique et qu'avec des doses supérieures ou inférieures on obtient des formes dérivées quantitativement. — *Cultures plus âgées.* A mesure que les cultures vieillissent, on voit l'eschare diminuer d'étendue. Après 30-40 jours, il faut doubler la dose pour provoquer des lésions équivalentes à celles que donnent les liquides clairs de 24 heures. — *Cultures chauffées une demi-heure à 55 degrés.* 4 cent. cubes réalisent le type A à tache violette, à peine humide. — *Cultures chauffées 5 minutes à 100 degrés.* 4 cent. cubes ne produisent qu'un empâtement transitoire.

CONCLUSIONS. — Dans le bouillon Martin glucosé à 2 p. 1.000, le bacille de Schmorl sécrète une toxine qui jouit de propriétés escharifiantes marquées, mais demeure pour ainsi dire sans action sur l'état général des sujets. L'injection de 4 cent. cubes de liquide clair (ou même de culture totale) n'amène jamais la mort des cobayes, mais ceux-ci sont assez souvent enlevés par des complications que favorise l'intensité des lésions locales. La toxicité maxima s'observe après 24 heures. Le poison résiste assez bien au vieillissement (en tube fermé) dans l'étuve, mais fléchit déjà nettement à 55 degrés (ses propriétés se modifient alors quantitativement et qualitativement).

INJECTION DE CULTURES LAVÉES.

Cultures de 24 heures. On sait qu'un cent. cube réalise le type E classique (quelquefois le type « exagéré » sans eschare) ; qu'avec des doses supérieures, l'eschare fait son apparition ; qu'avec des doses inférieures, les lésions diminuent de volume ; enfin, qu'avec des cultures soumises à un lavage trop poussé, on obtient le type tardif. — *Cultures plus âgées.* Les microbes mourant en quelques jours à l'étuve, dans le bouillon Martin glucosé, la réaction locale se borne très vite à un simple empâtément transitoire. — *Cultures chauffées une demi-heure à 55 degrés.* 4 cent. cubes réalisent le type B à tache pâle (à peine humide). — *Cultures chauffées 5 minutes à 100 degrés.* 4 cent. cubes ne produisent qu'un empâtément transitoire.

CONCLUSIONS. — Le bacille de Schmorl est peu virulent pour le cobaye, mais il l'est sans conteste, comme le démontrent l'existence du type tardif (consécutif à l'injection de cultures très lavées) et celle des formes extensives. Le bourbillon résulte de la nécrose de l'exsudat sous-cutané, par la toxine que fournissent les germes *in vivo* (1). La proportion de poison, sécrétée dans l'unité de temps, ne permet pas l'attaque des téguments ; pour obtenir celle-ci, il faut introduire, avec les germes, une quantité suffisante de toxine *disponible* comme dans le cas suivant.

INJECTION DE CULTURES TOTALES.

Cultures de 24 heures. Nous rappellerons qu'un cent. cube réalise le type C classique et que des doses supérieures ou inférieures engendrent des formes dérivées quantitativement. — *Cultures plus âgées.* Comme les germes périssent rapidement à 37 degrés, on tombe vite dans des types de moins en moins discernables du type A ; bientôt, il n'existe plus aucune

(1) Exclusivement dans le type tardif, en majeure partie dans le type E classique (il faut tenir compte, dans ce dernier cas, du poison non enlevé par le lavage, lequel suffit à déterminer le type D, quand on dépasse 1 cent. cube).

différence entre les effets de l'injection du liquide clair qui surmonte le dépôt microbien et de la culture préalablement agitée. — *Cultures chauffées une demi-heure à 55 degrés.* 4 cent. cubes réalisent le type B à tache violette (à peine humide). — *Cultures chauffées 5 minutes à 100 degrés.* 4 cent. cubes ne déterminent qu'un empatement modéré, avec quelques croûtelles.

CONCLUSIONS. — Nous avons dit que le type C représente la somme des types A et E; en réalité, il représente à la fois plus et moins. *Plus* : l'eschare ne sèche pas aussi vite; l'émaciation est toujours nette; on peut observer des nécroses hépatiques, inconnues dans les types A (naturellement) et E. — *Moins* : les formes extensives du type E ne s'observent jamais, ce qui tient (au moins en partie) à l'étendue de l'eschare, laquelle fait de la lésion sous-cutanée une lésion ouverte. Nous reviendrons plus tard sur ces questions (1).

INJECTIONS INTRAVEINEUSES

Pour éviter des redites inutiles, nous étudierons successivement ici : l'action des *cultures totales* (toujours en bouillon Martin glucosé à 2 p. 1.000 — 24 heures d'étuve), puis celle des *liquides clairs* et des *cultures lavées* qui leur correspondent.

CULTURES TOTALES.

Telles quelles.

Avec 1 cent. cube d'une culture bien toxique, seule considérée dans ce qui va suivre, on tue d'habitude l'animal « sur la table », c'est-à-dire que la symptomatologie se trouve réduite à sa plus simple expression. Immédiatement raideur générale;

(1) On a vu que la crépitation de l'œdème initial, observée dans le type C (sauf avec les germes qui fermentent peu le glucose), fait défaut dans les types A et E. La raison de cette différence est aisée à donner. Quand on injecte la culture totale, on introduit, sous la peau, un peu de glucose demeurant dans cette culture et des microbes susceptibles de continuer à le disloquer jusqu'à sa disparition complète. Quand on injecte des cultures lavées, on a éliminé, naturellement, toute trace de sucre. Quand on injecte du liquide clair, on n'introduit pas trace de zymase (laquelle est considérée comme exclusivement intracellulaire).

puis raptus, perte du réflexe cornéen, deux ou trois inspirations profondes et automatiques; finalement arrêt de la respiration et des battements cardiaques. — *A l'autopsie* : cœur immobilisé en systole, fins caillots entre les piliers ventriculaires, sang coagulable dans les délais normaux.

Avec un demi-cent. cube (et quelquefois 1 cent. cube), les sujets peuvent succomber en 5 à 15 minutes environ. On observe tout d'abord de l'hébétude et de la titubation, puis de brefs accès convulsifs. Bientôt l'animal tombe sur le côté; sa respiration devient très pénible (soif d'air) et ne tarde pas à s'arrêter, en même temps que les mouvements du cœur. Dans les cas rapides, une spume sanglante sort par les narines. — *A l'autopsie* : congestion des viscères abdominaux; œdème pulmonaire, avec foyers apoplectiques punctiformes; cœur immobilisé en systole, mais sans caillots dans les cavités ventriculaires; sang un peu moins coagulable que normalement.

Avec un demi-cent. cube, lorsque la mort ne survient pas en 5 à 15 minutes, elle est ordinairement retardée d'une à quatre heures. Les animaux présentent, au début, de la polypnée et de la stupeur. Ils restent immobiles, « aplatis », le museau contre le sol, dans une attitude de plus en plus nettement parétique. Puis, apparaît une vive sensibilité thoraco-abdominale. Lorsqu'on presse le sujet entre les doigts, il crie et saute violemment en avant, *d'une seule pièce*; si on insiste, il tombe sur le côté, s'agite, puis demeure inerte, dans un état de mort apparente (arrêt respiratoire, perte du réflexe cornéen, battements cardiaques imperceptibles). Bientôt le réveil a lieu, mais l'animal s'achemine peu à peu vers un coma mortel. Finalement, la respiration devient de plus en plus rare et superficielle, jusqu'à ce qu'elle s'arrête. Au cours des accidents, il n'est pas rare d'observer l'émission d'une urine sanglante ou laquée. — *A l'autopsie* : congestion, souvent violente (voire hémorragique), des viscères abdominaux; épanchement rosé habituel dans le péritoine; parfois, urine sanglante ou laquée dans la vessie. Cœur battant encore après l'arrêt de la respiration; sang incoagulable pendant un long temps.

Avec un quart de cent. cube, la mort a lieu en 6 à 12 heures environ. Même *symptomatologie* que précédemment, mais ici les phénomènes se déroulent avec moins de rapidité. Mêmes

lésions également, mais, en plus : taches congestives ou jaunâtres sur le foie (début de foyers nécrotiques).

Avec 1 à 2 dixièmes de cent. cube, l'animal succombe en un jour ou bien guérit. Les accidents observés sont peu caractéristiques : abattement, poil piqué, sensibilité thoraco-abdominale modérée. Si le sujet survit, il « s'en tire » avec une émaciation transitoire. Si, au contraire, la mort doit survenir, on voit se développer un état comateux progressif ; la respiration s'embarrasse de plus en plus et il est difficile de saisir le moment précis où elle cesse : *l'animal s'éteint*. — *A l'autopsie* : Congestion plus ou moins marquée des viscères abdominaux, avec épanchement rosé ou citrin dans l'abdomen. Taches nécrotiques, en général peu nombreuses, sur le foie (surface et bords). Ces taches offrent une étendue très variable (grain de mil, petite amande) ; petites, elles demeurent arrondies ; plus grandes, elles montrent, par confluence, un centre homogène et un contour irrégulier (*en jeu de patience*). Leur couleur varie selon leur âge ; d'abord amarante, elles deviennent ensuite saumonées, puis jaunes, puis cuir de botte. Parallèlement, leur consistance se montre de plus en plus ferme et leur aspect (à la coupe) de plus en plus sec. Elles contiennent toujours des bacilles de Schmorl. Les foyers de nécrose sont rares dans les poumons, la rate et les reins.

Chauffées.

Une demi-heure à 55 degrés. 2 cent. cubes répondent à un quart de cent. cube environ de culture non chauffée ; 1 cent. cube, à 1 ou 2 dixièmes. — *5 minutes à 100 degrés.* Aucun effet, avec 2 cent. cubes.

LIQUIDES CLAIRS.

D'une façon générale, on observe les mêmes accidents (rapides) qu'avec les cultures totales. Pour de fortes doses (un demi à 1 cent. cube), les différences d'activité se trouvent masquées par les différences de sensibilité des animaux ; pour des doses plus faibles, elles apparaissent nettement : ainsi un quart de cent. cube ne tue jamais. — Le *chauffage* amène le même fléchissement que dans les cultures totales.

CULTURES LAVÉES.

Avec 1 cent. cube, aucun effet ; si on sacrifie les cobayes, on n'observe pas de lésions internes. Avec 2 cent. cubes, il en va généralement de même ; cependant, certains sujets, plus sensibles que la moyenne, succombent en 5 à 6 jours, après avoir maigri considérablement. Dans ces cas, on trouve, à l'autopsie, des *foyers nécrotiques* et des *abcès* au niveau du foie. Avec plus de 2 cent. cubes, la mort survient d'habitude en 6 à 12 heures ; elle doit être rapportée à la présence de toxine « disponible » en quantité suffisante. — Le *chauffage* rend les cultures lavées inoffensives (à la dose de 2 cent. cubes et plus).

CONCLUSIONS.

Le bacille de Schmorl apparaît, ici encore, peu virulent pour le cobaye. Il est cependant susceptible d'un *développement local limité* dans le foie (rarement ailleurs), même quand on fait usage de cultures lavées (si les sujets possèdent une sensibilité suffisante).

La toxine, qui détermine la production d'une eschare humide sous la peau, engendre, dans les veines, une gamme de phénomènes dont l'acuité correspond à la dose administrée. Des quantités notables « assomment » les animaux, avec des coagulations intracardiaques — des volumes moins grands rendent au contraire le sang incoagulable (comme pour les venins) et provoquent une congestion viscérale intense, qui affecte principalement la circulation thoracique dans les cas les plus rapides et la circulation abdominale dans les cas plus lents — des doses suffisamment faibles ne tuent plus ou amènent la mort dans les 24 heures, sans modifier la « crase » du sang, en portant uniquement leur action sur les organes de l'abdomen.

On peut retrouver, au niveau du foie, *les deux lésions viscérales caractéristiques du bacille de Schmorl*, foyers nécrotiques et foyers suppurés, observées chez les diverses espèces animales.

INJECTIONS INTRAPÉRITONÉALES

Leurs effets sont aisés à résumer. Nous suivrons *le même ordre que pour les injections intraveineuses*.

CULTURES TOTALES.

Telles quelles.

Avec 1-2 cent. cubes, on tue en 6-12 heures environ. Les symptômes sont à peu près les mêmes que si l'on avait administré un quart de cent. cube par la voie sanguine; toutefois, comme il fallait s'y attendre, on note une intensité particulière de la réaction abdominale (ventre gros et toujours très sensible). — *A l'autopsie* : épanchement rosé ou hémorragique dans les cas rapides, rosé ou citrin dans les cas plus lents; fausses membranes fines, notamment sur le foie, quand la mort ne survient point trop vite; congestion plus ou moins marquée des viscères de l'abdomen. L'épanchement, généralement abondant, contient peu de bacilles spécifiques; dès que la terminaison dépasse un petit nombre d'heures, il s'y joint d'autres germes, avant tout les deux « germes de sortie » habituels des cobayes, pneumocoque et *pasteurella*. (Nous avons omis de mentionner leur apparition, observée de temps en temps, lors des injections intraveineuses).

Avec un demi-cent. cube, les sujets offrent une émaciation variable et rien de plus. Si on les sacrifie après quelques jours, on rencontre des taches nécrotiques sur le foie et, dans certains cas, de petits abcès encapsulés, à pus concret, au niveau de l'épiploon.

Avec 1 dixième de cent. cube, on ne détermine aucun symptôme anormal et l'autopsie (animaux sacrifiés) ne révèle aucune lésion.

Chauffées.

Une demi-heure à 55 degrés. Avec 4 cent. cubes, on voit apparaître des phénomènes abdominaux transitoires (ventre gros et sensible), accompagnés d'un amaigrissement plus ou

moins marqué et toujours suivis de guérison. — *Cinq minutes à 100 degrés.* 4 cent. cubes ne produisent qu'une émaciation modérée.

LIQUIDES CLAIRS.

4 cent. cubes correspondent, *grosso modo*, à 4 cent. cubes de culture totale chauffée à 55 degrés; 2 cent. cubes, à 4 cent. cubes de culture totale chauffée à 100 degrés. — 4 cent. cubes de liquide clair, chauffé une demi-heure à 55 degrés, ne provoquent qu'un amaigrissement transitoire; 4 cent. cubes de liquide clair, chauffé 5 minutes à 100 degrés, demeurent inoffensifs.

CULTURES LAVÉES.

Telles quelles.

Avec 3-4 cent. cubes, on n'arrive pas à tuer les sujets, mais ils maigrissent beaucoup. — *A l'autopsie* (animaux sacrifiés après quelques jours), on rencontre les mêmes lésions que chez les cobayes qui ont reçu un demi-cent. cube de culture totale.

Avec 1-2 cent. cubes, on provoque une émaciation variable. Si on sacrifie les sujets, on constate la présence de lésions hépatiques discrètes.

Chauffées.

Une demi-heure à 55 degrés. 4 cent. cubes demeurent quasi inoffensifs.

CONCLUSIONS.

Le bacille de Schmorl se montre, ici encore, peu virulent pour le cobaye, tandis que sa toxine détermine les accidents les plus graves. Les phénomènes observés se rapprochent beaucoup de ceux que produisent les injections intraveineuses, à la condition, toutefois, de forcer sensiblement les doses administrées.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le cobaye constitue un réactif excellent dans l'étude analytique du bacille de Schmorl in vivo. Les injections sous-cutanées permettent de faire la part exacte de la toxicité et de la virulence de ce microbe, grâce à un examen attentif des apparences qui se succèdent sous les yeux dans chaque groupe de cas; les injections intraveineuses restent indispensables pour compléter l'histoire de la toxicité; les injections intrapéritonéales, enfin, fournissent un utile contrôle aux notions déjà acquises.

Vis-à-vis du cobaye, le bacille de Schmorl manifeste une faible virulence. Les formes extensives (injections sous-cutanées) demeurent peu fréquentes; les localisations à distance (injections intraveineuses et intrapéritonéales), presque toujours limitées au foie, y conservent, somme toute, un caractère discret indéniable.

Par contre, le cobaye réagit bien à la toxine du bacille nécrosant. Au niveau des téguments, c'est une eschare humide à apparition rapide, lorsque la quantité de poison disponible le permet (filtrats, cultures totales); ou un bourbillon caractéristique, quand ce poison n'est sécrété qu'en minime proportion dans l'unité de temps (germes lavés). La peau fixe énergiquement la toxine, puisque les injections sous-cutanées n'altèrent pour ainsi dire pas l'état général. Mais que l'on vienne à introduire le poison dans le courant circulatoire, on en observera immédiatement les effets sur l'économie tout entière. — L'injection intrapéritonéale représente en quelque sorte, ici comme ailleurs, le « mode mineur » de l'injection intraveineuse.

LES VARIATIONS DE L'ALEXINE

APRÈS LE CHOC ANAPHYLACTIQUE

DANS LA SÉRO-ANAPHYLAXIE ACTIVE ET PASSIVE

par P.-F. ARMAND-DELILLE.

(Travail du laboratoire de Chimie thérapeutique de l'Institut Pasteur.)

L'étude de la nature du poison anaphylactique a été en ces dernières années l'objet de nombreux travaux; il faut citer entre autres ceux de Friedberger, qui est parvenu à obtenir *in vitro*, par le mélange d'un sérum antigène avec celui de l'animal préparé, un poison qu'il nomme anaphylotoxine, parce qu'il le considère comme identique à la substance toxique qui, dans l'organisme préparé, détermine les accidents anaphylactiques, au moment de l'injection déchainante.

Cet auteur, ayant reconnu que l'alexine est nécessaire à la constitution de son anaphylotoxine, a cherché à établir l'identité du poison obtenu *in vitro* avec le poison hypothétique qui se développerait dans l'organisme pour déterminer le choc anaphylactique. Reprenant sous une autre forme les premières recherches de Sleeswijk, il s'est basé sur une série d'expériences pour montrer qu'il se produit toujours, après le choc anaphylactique, une diminution plus ou moins considérable de l'alexine du sang circulant.

En contrôlant pour notre part ces expériences, nous avons été amenés à un certain nombre de constatations qui s'écartent de celles qu'a exposées Friedberger (1), et, en particulier, nous avons constaté une différence considérable entre l'anaphylaxie active et l'anaphylaxie passive au point de vue des variations de l'alexine. Comme ces faits ont une grande importance pour la doctrine de l'anaphylaxie, et comme ils paraissent en particulier devoir faire modifier les hypothèses de Friedberger sur la

(1) FRIEDBERGER U. HARTOCH, Über das Verhalten des Komplements bei der aktiven und passiven Anaphylaxie. *Zeitschr., f. Immunität*, t. III, 1910, p. 581.

constitution du poison anaphylactique, nous avons pensé qu'il serait intéressant de rapporter ici, avec plus de détails, les expériences dont les conclusions ont été récemment exposées dans une note à la Société de Biologie (1).

Sleeswijk, dans un travail fait dans le laboratoire de Bordet (2), a signalé le premier, que chez les cobayes anaphylactiques auxquels on fait l'injection déchaînante dans le péritoine, on peut observer une diminution de l'alexine dans le sang prélevé un certain temps après le choc anaphylactique.

Friedberger, un an après, a fait des constatations analogues, mais avec l'injection déchaînante intraveineuse, la 2^e prise de sang étant faite cinq minutes après le choc anaphylactique; aussi s'est-il considéré comme ayant découvert le fait, ce qui a nécessité une réclamation de priorité de la part de Sleeswijk, lequel a d'ailleurs par la même occasion contrôlé les expériences de Friedberger en se mettant exactement dans les mêmes conditions que cet expérimentateur (3), tandis qu'au contraire Tsuru a constaté qu'il n'y avait pas de diminution constante de l'alexine dans les différentes formes d'anaphylaxie sauf dans l'anaphylaxie passive par sérum hétérogène.

Nous avons cherché, pour notre part, à réaliser dans les mêmes conditions et avons pu ainsi reproduire les expériences de ces auteurs. Comme Tsuru, nous sommes loin d'avoir trouvé avec une aussi grande constance que Friedberger une chute nette de l'alexine dans l'anaphylaxie active, tandis que nous l'avons comme lui toujours trouvée considérable dans l'anaphylaxie passive. C'est le point qui nous a paru particulièrement intéressant et sur lequel nous insisterons en terminant.

Toutes nos expériences ont été faites de la manière suivante :

Les cobayes sensibles étaient, pour l'anaphylaxie active, des animaux préparés avec 0,01 cent. cube de sérum de cheval,

(1) P.-F. ARMAND-DELILLE, L'alexine joue-t-elle un rôle dans la constitution du poison anaphylactique? *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1^{er} juin 1912, t. LXXII, p. 869.

(2) SLEESWIJK, Zur Komplementfrage in der Serumanaphylaxie. *Zeitsch. für Immunitätsforsch.*, t. V, 1910, p. 580.

(3) Ces auteurs, même dans leurs travaux ultérieurs, netiennent pas compte, en effet, des recherches de Tsuru (Ueber Komplement abnahme bei der verschiedenen Formen der Anaphylaxie. *Zeit. f. Imm.*, 1910, t. IV, p. 612), qui n'avait trouvé aucune diminution de l'alexine après le choc anaphylactique.

au moins quinze jours auparavant, ou bien des animaux éprouvés avec du sérum antidiphtérique dans les mêmes conditions. La dose déchainante employée a été soit une dose minime, mais sûrement mortelle (0,02 cent. cube par 100 grammes d'animal), déterminée par des expériences préalables, soit des doses plus fortes lorsque nous employons du sérum chauffé. Nous avons, en effet, sur le conseil de M. Nicolle, expérimenté également avec du sérum chauffé pour être certains que le sérum de cheval frais n'apportait pas une quantité d'alexine suffisante pour pouvoir intervenir dans l'expérience.

Les prises de sang, toujours de 2 cent. cubes, étaient faites dans une des carotides, deux minutes avant l'injection déchainante, puis exactement cinq minutes après. Le sang était immédiatement centrifugé et le sérum aussitôt décanté, de sorte que l'étude du pouvoir alexique était faite une à deux heures après les prises de sang. Nous avons toujours employé un système hémolytique composé de globules de mouton (dilués au 20^e) et d'un sérum de lapin antimouton très actif; son activité était chaque fois titrée et les globules étaient sensibilisés avec six fois la dose active. Les quantités de sérum étaient graduées de 0,003 à 0,1. Les résultats de l'hémolyse étaient notés minute par minute pendant une demi-heure, à 38 degrés, puis, le lendemain, au bout de vingt-quatre heures, à la température du laboratoire. Pour l'anaphylaxie passive, nous avons employé du sérum de lapins préparés par cinq à six injections. Nettement précipitante, la dose injectée au cobaye dans le péritoine était de 1 cent. cube par 100 grammes d'animal. La réaction hémolytique était toujours faite en même temps qu'une ou plusieurs séries d'anaphylaxie active.

Voici deux types d'expériences, l'une pour l'anaphylaxie active, l'autre pour l'anaphylaxie passive. Nous ne donnerons qu'un tableau résumé de nos autres expériences, afin de ne pas surcharger inutilement cet exposé.

30 mai. — Cobaye A, en anaphylaxie active. Poids : 290 grammes. Reçoit dans la veine jugulaire, par 100 grammes, 0,02 de sérum de cheval, soit : 1,5 cent. cube de dilution à 1/25.

4 h. 8, saignée, 2 cent. cubes; 4 h. 11, injection déchainante; 4 h. 13,

dyspnée; grandes secousses répétées; 4 h. 15, saignée, 2 cent. cubes; 4 h. 16, mort.

Expérience faite à 5 h. 40, avec sérum obtenu par centrifugation des caillots et globules de mouton sensibilisés avec six fois la dose active.

DOSE D'ALEXINE avant l'injection.	HÉMOLYSE	DOSE D'ALEXINE 5 m. après l'injection.	HÉMOLYSE
0,005	Nulle, même ap. 24 heures.	0,005	Nulle, même ap. 24 heures.
0,01	Nulle, même ap. 24 heures.	0,01	Nulle, même ap. 24 heures.
0,02	Légère en 30 minutes, partielle après 24 heures.	0,02	Très légère en 30 min., partielle après 24 heures.
0,03	Partielle en 30 min., presque totale en 24 heures.	0,03	Partielle en 30 min., presque totale en 24 heures.
0,05	Totale en 15 minutes.	0,05	Totale en 15 min. (très léger retard).
0,10	Totale en 10 minutes.	0,10	Totale en 10 minutes.

Il y a eu un léger retard pour les doses hémolysantes, mais excédant à peine deux ou trois minutes; l'hémolyse est à peu de chose près parallèle avec l'alexine avant et après la dose déchainante.

30 mai. — Cobaye B. Anaphylaxie passive. Poids : 440 grammes. Reçoit dans la veine jugulaire, par 100 grammes, 0,02 de sérum de cheval, soit 2,5 cent. cubes de dilution au 1/25.

4 h. 32, saignée, 2 cent. cubes; 4 h. 36, injection déchainante; 4 h. 39, petites secousses; dyspnée intense, état asphyxique; 4 h. 41, saignée, 2 cent. cubes; 4 h. 42, la dyspnée et l'asphyxie diminuent; l'animal se remet; 4 h. 48, l'animal est tout à fait remis.

Expérience faite à 5 h. 40 avec sérum obtenu par centrifugation des caillots et globules de mouton sensibilisés avec six fois la dose active.

DOSE D'ALEXINE avant l'injection	HÉMOLYSE	DOSE D'ALEXINE après l'injection.	HÉMOLYSE
0,005	Nulle, même ap. 24 heures.	0,005	Nulle, même ap. 24 heures.
0,01	Nulle, même ap. 24 heures.	0,01	Nulle, même ap. 24 heures.
0,02	Légère en 30 min., partielle après 24 heures.	0,02	Nulle.
0,03	Partielle en 30 min., presque totale en 24 heures.	0,03	Nulle, même ap. 24 heures.
0,05	Totale en 15 minutes.	0,05	Nulle, même ap. 24 heures.
0,10	Totale en 5 minutes.	0,10	Nulle, même ap. 24 heures.

Par conséquent, même à la forte dose de 0,1 de sérum frais, il n'y a plus aucun pouvoir alexique dans le sang pris après l'injection.

Comme on le voit, nos résultats sont loin de concorder avec ceux de Friedberger pour l'anaphylaxie active; alors que cet auteur trouve toujours une chute de l'alexine dans le sang recueilli après le choc anaphylactique, et 5 minutes après l'injection déchainante, nous n'avons observé ce phénomène que d'une manière inconstante et légère; nous sommes donc d'accord avec Tsuru sur ce point; au contraire, pour l'anaphylaxie passive, nous trouvons, comme Friedberger, une très forte diminution de l'alexine à la condition d'employer pour la provoquer un sérum hétérogène, résultats absolument différents de ceux de Tsuru, lorsque cet auteur a provoqué l'anaphylaxie passive en employant du sérum de cobaye hypersensibilisé, mais concordants lorsque, comme Friedberger et comme nous, il a employé du sérum de lapin hypersensibilisé.

Nous donnons ci-dessous le tableau comparatif de nos résultats :

1^o Anaphylaxie active.

N ^{os} de l'expérience.	DATE	POIDS des cobayes.	DOSE déchainante intraveineuse.	RÉSULTAT	ACTION DE L'ALEXINE prélevée 5 minutes après l'injection déchainante.
1	1911 28 déc.	295 gr.	Sér. frais 0,09	Mort en 5 min.	Léger retard de l'hémolyse.
2	28 déc.	440 gr.	Sér. frais 0,12	Mort en 6 min.	Très léger retard.
3	1912 3 févr.	415 gr.	Sér. frais 0,12	Mort en 7 min.	Pas de retard.
4	3 févr.	315 gr.	Intrapérit. 3 c.c.	Se remet.	Pas de retard.
5	15 févr.	320 gr.	Sér. frais 0,09	Se remet.	Très léger retard.
6	15 févr.	310 gr.	Sér. frais 0,10	Mort en 11 min.	Pas de retard.
7	22 févr.	235 gr.	Sér. chauffé 1 c.c.	Mort en 10 min.	Retard net.
8	22 févr.	250 gr.	Sér. frais 0,06	Mort en 10 min.	Très léger retard.
9	25 mars.	230 gr.	Sér. chauffé 1 c.c.	Se remet.	Pas de retard.
10	30 mai.	230 gr.	Sér. chauffé 0,06	Mort en 5 min.	Très léger retard.
Témoin.	25 mai.	An. neuf 410 gr.	Sér. frais 1 c.c.	Aucun symptôme.	Pas de retard.

2^e Anaphylaxie passive.

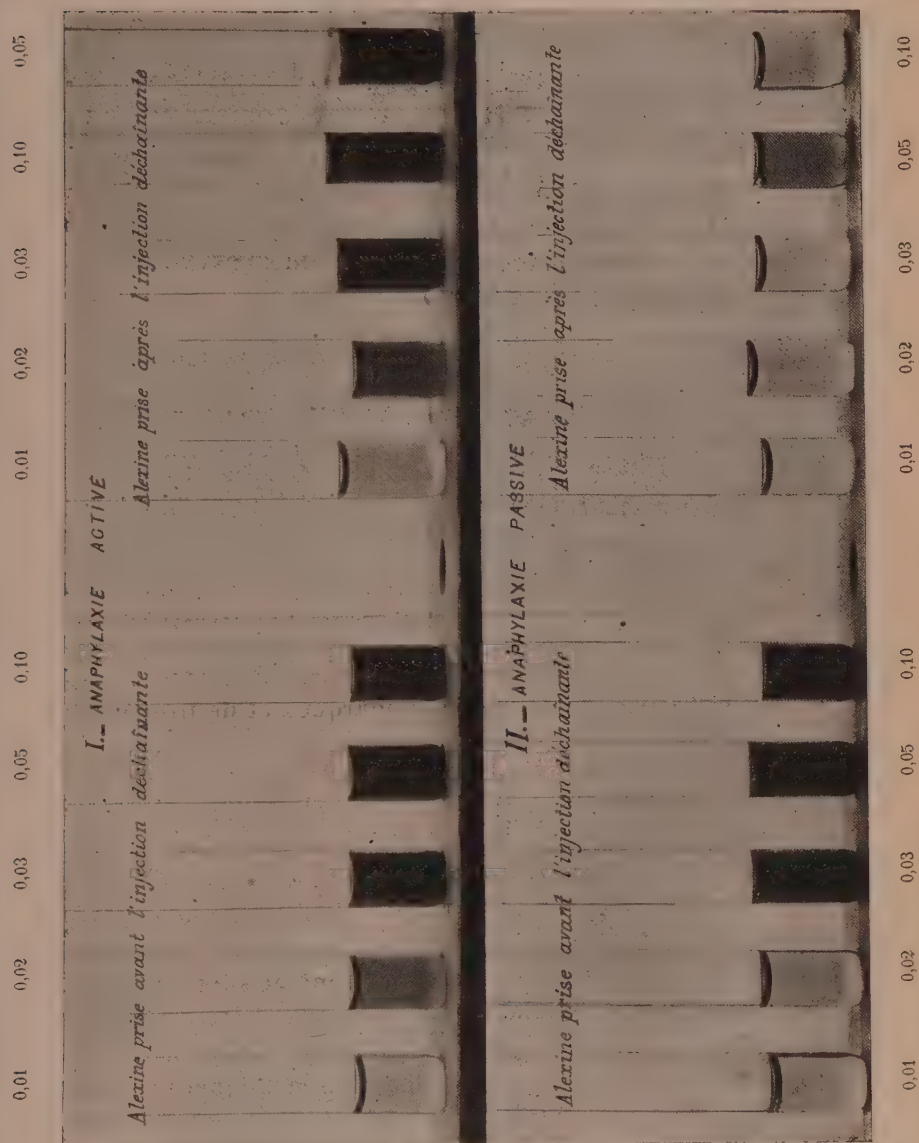
n ^{os} de l'expérience	DATE	POIDS des cobayes.	DOSE déchaînante intraveineuse.	RÉSULTAT	ACTION DE L'ALEXINE prélevée 5 minutes après l'injection déchaînante.
1	1912. 16 mars.	300 gr.	Sérum chauffé 1 c.c.	Se remet.	Hémolyse nulle à 0,02 même en 24 heures alors que totale à 0,01 en 15 min. dans le témoin.
2	16 mars.	330 gr.	Sérum chauffé 1 c.c.	Mort en 20 minutes.	Hémolyse nulle en 24 h. à 0,01 alors que totale en 15 minutes dans le témoin.
3	30 mai.	440 gr.	Sérum frais 0 c.c. 10.	Se remet.	Hémolyse nulle après 24 h. à 0,03 alors que totale dans le témoin.
Témoin cobaye injecté sér. lapin frais.	20 juin.	320 gr.	Sérum chauffé 1 c.c.	Aucun symptôme.	Aucun retard.

A la suite de ces expériences, il nous est permis, nous semble-t-il, de formuler quelques remarques et de tirer quelques conclusions intéressantes.

Tout d'abord, il est loin d'être démontré que l'alexine soit nécessaire à la constitution du poison anaphylactique *in vivo*; en effet, dans l'anaphylaxie active, où les phénomènes sont les plus graves et presque toujours mortels, la diminution de l'alexine est loin d'être constante; il y a des cas où elle est imperceptible, pour ne pas dire nulle, ce qui est en opposition avec la diminution considérable de cette même substance dans l'anaphylaxie passive, quand même les accidents sont légers et non mortels.

Dans ces conditions, comment peut-on expliquer la diminution si considérable de l'alexine dans l'anaphylaxie passive par sérum hétérogène? On peut faire à ce sujet plusieurs hypothèses; la plus légitime, à notre avis, est d'admettre que l'alexine se fixe sur les précipitines ou sur des anticorps qui

coexistent avec les précipitines, car, nous l'avons vu, le sérum de lapin qui est injecté pour produire l'anaphylaxie passive est



toujours fortement précipitant, tandis que le sérum des cobayes en anaphylaxie ne l'est pas ou à peine.

Nous en arrivons donc aux conclusions suivantes :

Étant donné que l'alexine ne diminue que faiblement ou, dans certains cas, ne varie même nullement après le choc anaphylactique mortel de l'anaphylaxie active, il n'est pas démontré que le complément soit nécessaire à la constitution d'un poison anaphylactique qui se produirait dans le sang circulant. La variation de l'alexine paraît donc être, ainsi que l'a très justement dit Sleeswijk, un phénomène contingent et comme le font entrevoir certains travaux récents (1), il est tout aussi légitime de supposer que l'anaphylaxie peut être produite par des modifications qui se passent au sein même de la cellule, lorsque le sérum antigène arrive à son contact.

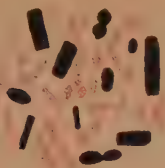
(1) Signalons, dans cet ordre d'idées, les très intéressantes recherches de Launoy et de Schultz, portant sur l'anaphylaxie cellulaire.

L. LAUNOY, Production et caractères du choc anaphylactique sur le cœur isolé du cobaye hypersensibilisé au sérum de cheval (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 9 mars 1912, p. 403, t. LXXII), et : Des conditions nécessaires à la démonstration du choc anaphylactique sur le cœur isolé d'animaux hypersensibilisés au sérum de cheval (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 25 mai 1912, p. 895, t. LXXII).

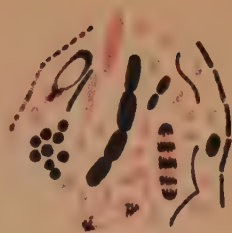
SCHULTZ, Including reaction of muscle from non sensibilised, sensibilised tolerant and immunised Guinea pigs (Physiological studies on anaphylaxis). (*Hygiene Laboratory, Public Health and marine Hospital service of Un. States. Bull.*, 1080, 1912.

Le Gérant : G. MASSON.

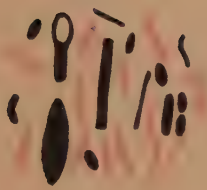
Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.



1



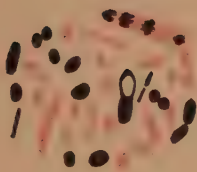
2



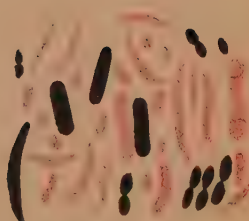
3



4



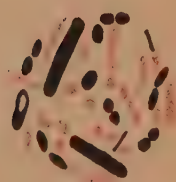
5



6



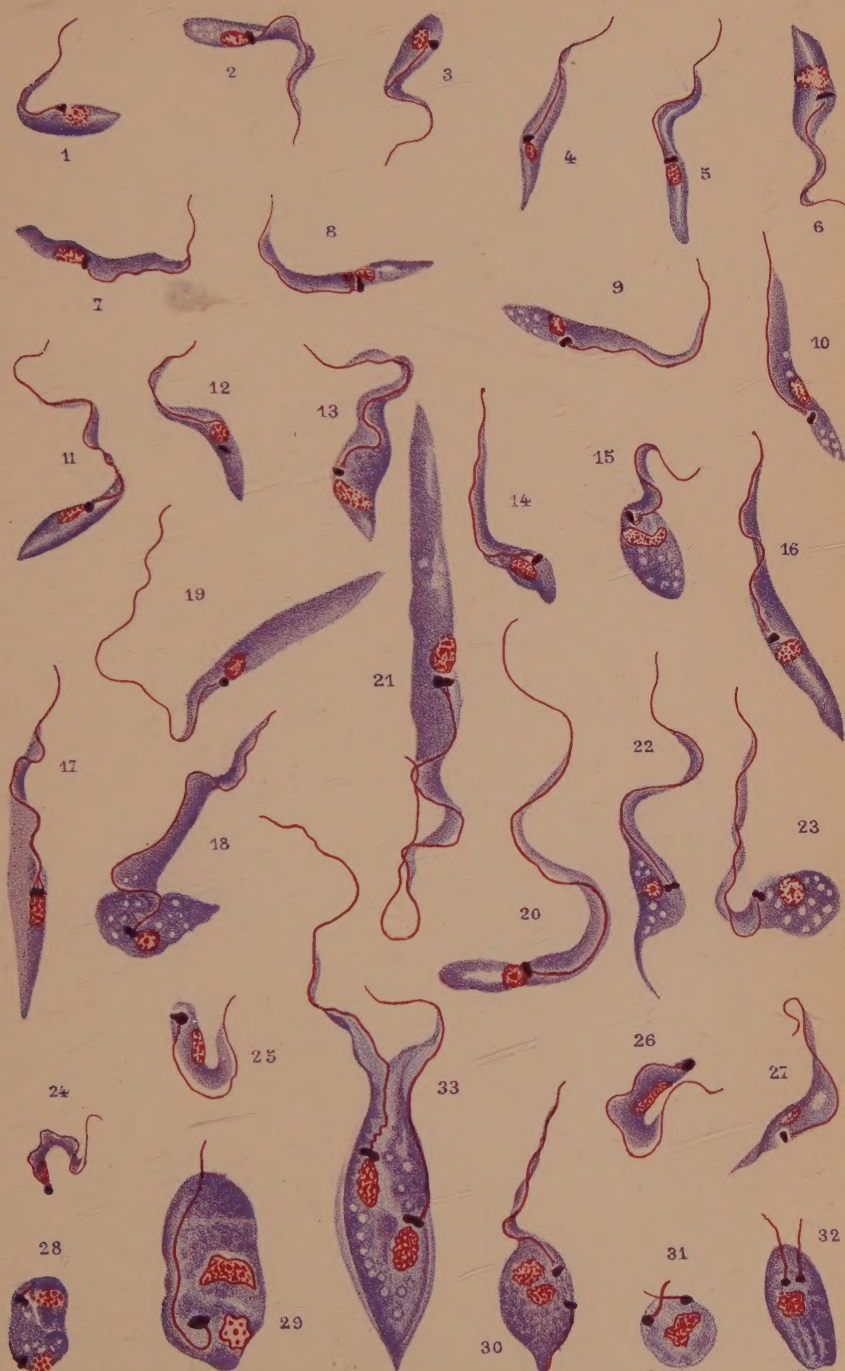
7



8

E. Metchnikoff del.

J. Roussel lith.



C. Constantin del.

V. Roussel lith.



C. Constantin del.

V. Roussel lith.

